

ドクダミの抗アンドロゲン作用に関する研究

著者	猿田 由香利
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2007
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00000901/

修士学位論文

ドクダミの抗アンドロゲン作用に関する研究

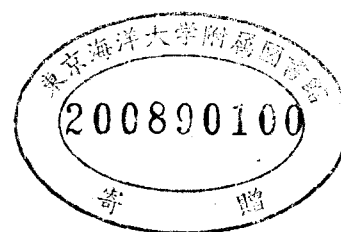
平成19年度
(2008年3月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

食機能保全科学専攻

猿田 由香利



目次

第1章 序論.....	1
1-1 健康食品の現状.....	1
1-2 男性更年期障害.....	2
1-3 男性更年期障害の治療.....	3
1-4 前立腺肥大症の社会的背景.....	3
1-5 前立腺肥大症の病態.....	5
1-6 前立腺肥大症の症状.....	6
1-7 前立腺肥大症の疫学.....	7
1-8 前立腺肥大症の治療の現在.....	7
1-8-1 $\alpha 1$ 遮断薬.....	9
1-8-2 抗男性ホルモン薬.....	9
1-9 男性ホルモンが前立腺細胞に作用する経路.....	10
1-10 本研究の目的.....	11
第2章 実験系について.....	12
2-1 ホルモン作動性に関する研究方針.....	12
2-2 試薬、その他.....	13
2-3 実験動物の飼育と管理.....	13
2-4 前立腺肥大モデルマウスの作成.....	14
2-5 LNCaP 細胞を用いての細胞増殖試験.....	16
2-6 ドクダミとは.....	19
2-7 ドクダミの実験材料について.....	20
第3章 ドクダミの抗アンドロゲン作用に関する研究.....	21
3-1 ドクダミ抽出物投与による前立腺肥大モデルマウスの抑制効果.....	21
3-2 ドクダミ抽出物の投与量検定実験.....	23
3-3 ドクダミ抽出物の抽出方法の違いによる投与実験.....	25

3-4	ドクダミ抽出物のポジティブコントロールとの比較実験	28
3-5	ケルシトリン投与実験	30
3-6	非去勢マウスを用いた前立腺肥大モデルに及ぼす影響	33
第4章	ドクダミの抗アンドロゲン作用におけるメカニズム解明	35
4-1	Testosterone 添加による LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響	35
4-2	DHT 添加による LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響	37
第5章	ドクダミ抽出物の分画	39
5-1	概要	39
5-2	ドクダミ分画物投与のマウス前立腺に及ぼす影響	40
5-3	ドクダミ分画物 (fr.1~fr.4) 添加の LNCaP 細胞に及ぼす影響	43
5-4	ドクダミ分画物 (fr.4-1~fr.4-3) 添加の LNCaP 細胞に及ぼす影響	45
5-5	ドクダミ分画物 (fr.4-1-1, fr.4-1-2) 添加の LNCaP 細胞に及ぼす影響	47
5-6	ドクダミ分画物投与のマウス前立腺に及ぼす影響	49
5-7	考察	52
第6章	総括	58
	参考文献	60
	謝辞	66

第1章 序論

1-1 健康食品の現状

近年、わが国においては、代替医療の普及と高齢者人口の増加に伴い、健康増進や疾患の予防・治療を目的として健康食品への関心が高まっている。欧米では、民間薬として伝承されてきたメディカルハーブを医療の現場において積極的に活用しており、本国でも健康食品として容易に入手可能である。特に高齢者では、医薬品とともに健康食品の摂取率が高く、この傾向は今後益々増加すると予想される。

高齢社会が進み、特に高齢男性に問題となるのが男性更年期障害であり、その中でも前立腺肥大症が代表である。前立腺肥大症を予防するというテーマは極めて緊急かつ重要なテーマであると認識している。

ヨーロッパをはじめ日本でも前立腺肥大症（BPH）の治療薬として使用されているノコギリヤシ果実エキスやペボカボチャの種子エキスの有用性は、一般にも認知されはじめておりヨーロッパではすでに治療薬として認可され、医療現場で盛んに使われている[1]。しかしノコギリヤシは 5α リダクターゼを阻害する作用が確認されているが、有効成分は未だはっきりしていない。このようにヘルスフードといわれるものの中には中高年男性の加齢に伴う、前立腺肥大症患者のQOL改善などに貢献しているものがある。しかし前立腺肥大症に有効なヘルスフードはあまり見つかっておらず、選択肢の幅が狭く自分に合った予防・治療法がないのも現状である。

一方で健康食品の使用頻度が増大するに従い、その過剰摂取による健康被害や医薬品と併用した場合の有害事象が報告されている。しかしながら、メディカルハーブを含めいわゆる健康食品、ヘルスフードに関しては医薬品の場合と比較して、有効性についてそのメカニズムを含めた科学的検証は未だ十分とは言えず、健康食品それ自体の有害事象や医薬品との相互作用に関して信頼できる情報の提供も行われていない[2]。従って、健康食品の適正な使用を確保するためには、有効性及び安全性に関する科学的検証が急務といえる。

1－2 男性更年期障害

近年、わが国においても性に対する認識が変化するとともに、男性更年期の概念が社会的に高い関心をもたれるようになった。男性更年期障害は男性ホルモンである Testosterone が減少し、ホルモンバランスの崩れが原因とされている。男性更年期障害の特徴として、臨床症状として自覚症状は、精神・心理症状、身体症状、性機能関連症状の 3 つに分けられ、ほてりや冷え、精神的にはうつ症状や不眠、体力的には筋力の衰え、性的には性欲の減退などが現れる。他覚的症状としては、骨密度減少、筋肉量及び筋力の低下、貧血、脂肪増加、性機能低下、認知力低下、体毛減少などが認められる。いずれの症状も高齢男性の QOL（Quality Of Life、生活の質）を低下させる大きな問題となっている。

Testosterone は男性の性徴を維持するのみならず、筋肉、骨、脳といった組織の機能を維持する重要な働きを有し、性腺機能不全例に Testosterone 補充療法を行うと、骨量、筋力、性欲などが改善されることが確認されている。一方、加齢とともに精巣機能は低下する結果、血中男性ホルモン値は低下して行き、これら症例に性腺機能不全例と同様な症状を伴うことがある。

生体内の代表的な男性ホルモンの Testosterone は、血中において性ステロイドホルモン結合蛋白質やアルブミンと結合した蛋白結合型あるいは遊離型として存在する。男性の加齢による変化を蛋白結合型と遊離型の和である総 Testosterone 値でみると、70 歳代の 20%、80 歳代の 50%は正常成人閾値より低いが、遊離型 Testosterone 値は、80 歳代では 90%以上が低値である。また 65 歳以上の健常男性の 60%以上は、遊離型 Testosterone 値が 30～35 歳の正常値以下となる[3]。

1－3 男性更年期障害の治療

男性更年期障害に対する Testosterone 補充療法の基準にコンセンサスはまだ得られていないが、アンドロゲン欠乏症状があり、総 Testosterone 値が 2 ng/ml 以下なら補充療法を、4 ng/ml 以上は正常域、2~4 ng/ml ならより詳しい検査として遊離型 Testosterone 値あるいは bioavailable Testosterone（遊離型とアルブミン結合型の Testosterone 値の和）を測定し、これらの詳しい検査ができなければ LH (Lutenizing Hormone、黄体化ホルモン)、FSH (Follicle Stimulating Hormone、卵胞刺激ホルモン)を測定、低値ならプロラクチン値を測定し、異常例は MRI (magnetic resonance imaging) を行うこととなる[4]。

Testosterone の同化作用は広く知られ、性腺機能不全例に Testosterone を投与すると、気力の改善、筋力・骨塩量の増加、性機能や性行動の改善などが見られ、筋力・骨塩量に関しては長期にわたって有効である[5,6,7]。

米国における Testosterone の処方量は、2000 年に 1993 年の約 5 倍に増加しており、今後も更に使用量の増加が予想される。現在、わが国の高齢化は急速に進んでおり、65 歳以上の人口は 2000 年に 17.4%であったが、2050 年には 35.7%と予想されている。今後、高齢男性の QOL 向上のためにもホルモン補充療法の必要性がより高まってくることが予想される。

1－4 前立腺肥大症の社会的背景

前立腺肥大症は、高齢男性に最もよくみられる排尿障害の原因となる前立腺の良性腫瘍で、前立腺癌と明らかに異なる良性疾患である。その有病率は高く、加齢とともに増加する。前立腺肥大症は組織学的に 60 歳の男性では 50%以上に、85 歳までに約 90%に認められ、その 1/4 に臨床症状が出現する[8]。

前立腺肥大症は疾患の進行に伴い、①前立腺組織の解剖学的増大、②排尿障害を主とした臨床症状、③尿流動態からみた下部尿路通過障害(閉塞)が出現するが、さらに通過障害に起因する膀胱排尿筋機能の変化などが出現し、これらが相互に関連して症候性前立腺肥

大症が疾患として成立する。患者のなかには、解剖学的増大と尿路通過障害所見を認めるが臨床症状を伴わない患者から上記のすべて病態をもつ患者まで多様である[9]。

日本における前立腺肥大症の患者数は年々増加しており、厚生労働省の患者調査によると1987年では13万5千人であった総患者数が2005年では45万9千人と報告されている(図1)。前立腺肥大症治療に費やされる医療費は1992年度760億円(入院270億円、外来490億円)から1997年度1,480億円(入院480億円、外来1,000億円)へと大きく増加しているが、この間、前立腺肥大症に対する手術件数は年間4.5~5.5万例程度で手術件数はほぼ一定に保たれており、1993年度に市場化された α 1遮断薬による市場の拡大によるところが大きい。今後、超高齢化社会に突入するにつれ、前立腺肥大症患者はさらに増え続けると予想される[10,11]。

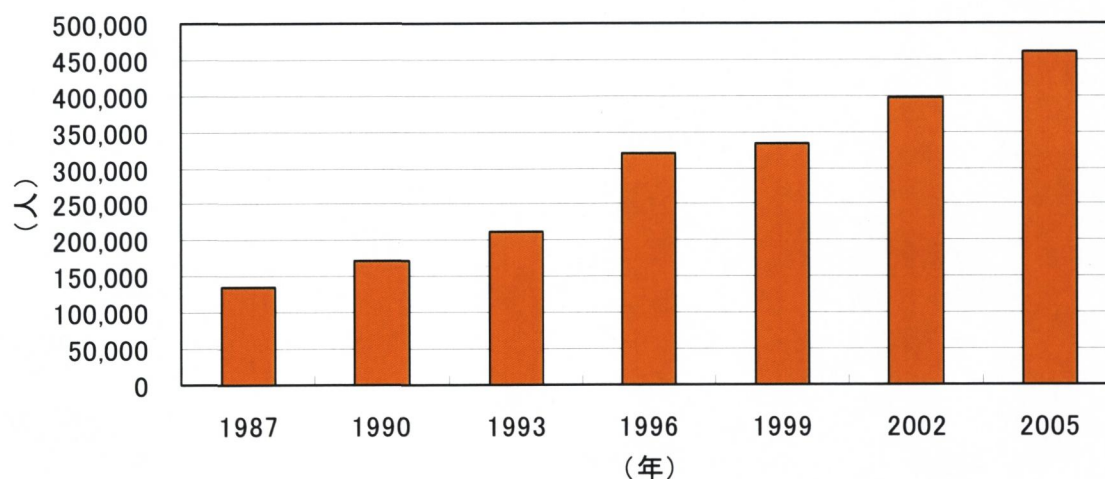


図1 前立腺肥大症患者数の年次推移

厚生労働省「患者調査」より

1 - 5 前立腺肥大症の病態

前立腺肥大症の病態は前立腺腫が増大すると、尿道抵抗が高まり、その結果として膀胱機能が影響を受け、複雑な様相を呈する。閉塞に伴う膀胱機能の変化による症状は排尿困難以外に頻尿、尿意切迫感、夜間頻尿などの刺激症状も現れる。

前立腺肥大症は組織学的には細胞数の増加でありその結果として、組織の増大を引き起こすものである。前立腺腺腫の最初の発生部位は尿道周囲の移行帯に生じる。初期の尿道周囲に生じる結節の成分は間質のみで形成されている。間質で形成された結節が腺増生を誘導し、成熟した肥大結節へと進展する。20 年にも及ぶ前立腺肥大症の進展過程の初期における優勢な現象は結節の数が増加することである。続いて、個々の結節の大きさが増大する。とくに、腺性の結節の大きさは間質性の結節の大きさと比べて大きなことが多い。なお、間質性の結節と腺性の結節の割合は個々の症例でさまざまである。

前立腺の平滑筋が容積として占めている割合は大きく、その筋の緊張はアドレナリン作動性神経系により調節されている。前立腺にアドレナリン作動性刺激を加えると、平滑筋が収縮を起こす以外に他の反応も起こっている可能性がある。一方、アンドロゲンを低下させると上皮細胞数は減少するが、平滑筋を含む間質細胞数は影響を受けない。しかし、間質細胞の機能はアドレナリン作動性刺激の他に、アンドロゲンによっても関与を受けている可能性がある[12]。

前立腺肥大症に伴う排尿症状は前立腺の大きさの増大とともに解剖学的構造も要因として生じる。また、ヒト前立腺においては腺腫の外側に被膜が存在することも重要な要因であり、腺腫を切除せず、被膜に至るまで腺腫に切開を加えることで、尿道抵抗が低くなり排尿状態が改善する症例もある[13]。

尿道閉塞に対する膀胱平滑筋の初期の反応は肥大である。膀胱平滑筋の肥大は尿流を維持するための膀胱内圧の増加に順応した結果であるが、膀胱平滑筋細胞の細胞外、細胞内の変化を起こし、不安定膀胱を呈する機序となるものと思われる。尿道閉塞に伴う膀胱肉柱形成はコラーゲンの増加によるものである[14]。

1-6 前立腺肥大症の症状

前立腺肥大症による排尿症状は、尿道閉塞自体から直接的に生じた排尿困難と、尿道閉塞から二次的に生じた膀胱機能の変化に関連した刺激症状とがある。国際前立腺症状スコア(I-PSS)が症状を定量的に評価するために使用されている(表1)。評価項目は7項目で残尿感、排尿間隔、尿線途絶、排尿の我慢、尿勢、腹圧排尿、夜間排尿回数についてである。国際前立腺症状スコアの合計点から症状の程度を軽度、中等度、重度の3段階に区分する。0~7点、8~19点、20~35点がそれぞれ、軽度、中等度、重度に相当する。治療効果の判定、症状の増悪を把握するために有用であり、まずこのスコアをもとに治療指針が立てられることになる(表1)。しかし、国際前立腺症状スコアは前立腺肥大症以外に、尿路感染、膀胱腫瘍、神経因性膀胱などが存在すれば高値となり、前立腺肥大症に特異的な診断項目ではないことに留意するべきである。また、スコアが同じであっても、個々の患者の困窮度は異なるために、必ず、QOLスコアを評価することが必要である[12]。

表1 国際前立腺症状スコア(I-PSS)

どのくらいの割合で次のような症状がありましたか？	全くない	5回に1回より少ない	2回に1回より少ない	2回に1回くらい	2回に1回より多い	ほとんどいつも
この1ヶ月の間に、尿をした後にまだ尿が残っている感じがありましたか？	0	1	2	3	4	5
この1ヶ月の間に、尿をしてから2時間以内にもう一度しなくてはならないことがありましたか？	0	1	2	3	4	5
この1ヶ月の間に、尿をしている間に尿が何度もとぎれることがありましたか？	0	1	2	3	4	5
この1ヶ月の間に、尿を我慢するのが難しいことがありましたか？	0	1	2	3	4	5
この3ヶ月の間に、尿の勢いが弱いことがありましたか？	0	1	2	3	4	5
この1ヶ月の間に、尿をし始めるためにお腹に力を入れることがありましたか？	0	1	2	3	4	5
この1ヶ月の間に、夜寝てから朝起きるまでに、ふつう何回尿をするためにおきましたか？	0回	1回	2回	3回	4回	5回
	0	1	2	3	4	5

1-7 前立腺肥大症の疫学

前立腺肥大症には人種あるいは地理的要因による頻度の差異があることは確かなようである。本症の頻度は東洋人、白人、黒人の順序で高くなる。前立腺肥大症による死亡率(対人口10万あたり)の集計をみると、わが国をはじめアジア大陸では低く、北欧諸国で高く、米国や南米諸国は中間に位置する。また、欧州大陸では南から北になるにつれ高頻度となる傾向がある。

本症の頻度に対する社会的環境因子の関与は因子が複雑で、正確な対照比較試験やコホート研究が実施されていないので定かではない。学歴が高く年収も中程度以上の者の危険因子が高いとされている。性生活や結婚に関する調査では、独身者にやや低い傾向や、結婚生活が長く高年齢まで性的にアクティブな者に多いことが示唆されているが、性欲や性行為の多寡を危険因子とするのに否定的な見解もある[16]。この分野における系統的な研究は乏しく、結論は今後の研究を待つ必要がある。

1-8 前立腺肥大症の治療の現在

前立腺肥大症で死亡する例は非常に少ないが、その症状を治すことができずに困惑している例は多い。昼間の活動が制限されたり、夜間の睡眠が不十分となり、QOLが著しく低下する。前立腺肥大症の治療は患者の有する症状の程度が同一でも、困窮度には大きな違いがあるので、患者自身が中心的役割を果たすべきである[18]。

治療法は重症度に応じて経過観察、薬物療法、手術療法などが行われている。経過観察のみで尿道閉塞が慢性的に長期に経過した場合には、不可逆的な膀胱収縮力の低下が起こることがある。なお、腺腫の過形成が組織学的にあり、尿流動態的に閉塞があっても、困窮度が弱い前立腺肥大症例においては経過観察のみを行った場合、重篤な合併症が起こるかどうかは不明である。薬物療法では、 α_1 遮断薬と抗アンドロゲン剤が用いられている。 α_1 遮断薬には前立腺腺腫を縮小させる作用はないが、尿道抵抗を低下させる作用をもち、その効果が即効性であることから第1選択薬とされている。抗アンドロゲン剤は前立腺腺

腫を縮小させる作用を有するが、勃起障害の副作用があること、効果発現まで 1～2 ヶ月を必要とすること、前立腺癌をマスクすることなどの短所もある。また、その他の薬物療法としては植物エキス製剤、アミノ酸製剤、漢方薬などがあるが、その作用機序や有用性については、十分解明されておらず、今後の検討が必要である。

前立腺肥大症における排尿障害は、前立腺の肥大とそれに伴う交感神経の過緊張状態、局所粘膜の浮腫・炎症などが加わった結果と考えられることができる。したがって、排尿障害は、①腺腫の肥大、②尿管の緊張、③浮腫・炎症などの因子が関与しているので、個々の例における各因子の関与の程度により、各薬物療法の効果が異なってくると考えられる。

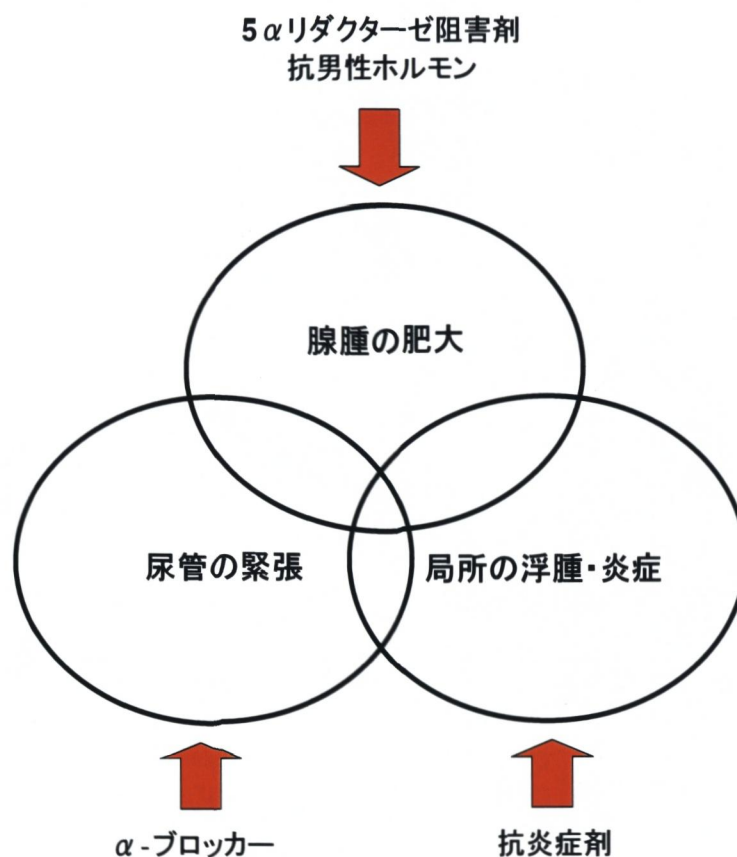


図2 前立腺肥大症の排尿障害に関与する因子と
それぞれに対応する薬物療法

1－8－1 $\alpha 1$ 遮断薬

$\alpha 1$ 遮断薬は膀胱頸部および前立腺の平滑筋を弛緩させることで尿道抵抗を低下させ、排尿障害を改善させる。血管をはじめとする平滑筋における α 受容体の機構が明らかになりつつあり、下部尿路および前立腺により選択的に作用するものが副作用の軽減を目的として種々開発されている。比較的効果の発現が早く、中長期の効果も認められており、薬物療法の標準的治療である。副作用として、起立性低血圧、めまいなどがみられるが、前立腺に対して、より選択性の高いものではその頻度が低いことが報告されている。

1－8－2 抗男性ホルモン薬

抗男性ホルモン薬は前立腺の容積を縮小させ、下部尿路通過障害を改善し症状を軽減させる。効果発現は緩徐で、投薬の中断により前立腺の容積は再度増大することが報告されている。副作用は性欲減退、勃起障害など、主に性機能に関連するものである[18,19]。

1-9 男性ホルモンが前立腺細胞に作用する経路

図3は男性ホルモン（アンドロゲン）が前立腺の細胞に作用する経路を表したものである。脳の視床下部からゴナドトロピン放出ホルモンが分泌され、それが下垂体に働きかけ、ゴナドトロピンの分泌が促進される。そのゴナドトロピンは血中を通過して精巣に取り込まれ、男性ホルモン（Testosterone）分泌を刺激する。さらにその Testosterone は血中を通過して前立腺細胞内に取り込まれ、細胞内の 5α 還元酵素（ 5α -Reductase）によって男性ホルモンとしてより活性の高い Dihydrotestosterone (DHT) へと変換される（図4）。その後、DHT は細胞核内の受容体と結合し複合体を形成し、DNA に働きかけてタンパク質合成を制御する。このように男性ホルモンは前立腺の作用を支配していることになる。

この経路のどこかを遮断すれば、前立腺肥大を起こさないようにできるのではないかと考えられるが、視床下部や下垂体のホルモンの分泌を阻害するとその結果、男性ホルモンそのものが作られなくなるため、性機能の低下や運動能力の低下といった深刻な問題を引き起こすことになる。そのため、現在では 5α -Reductase を阻害することにより Testosterone の DHT への変換を阻害するか、アンドロゲンの受容体との結合を阻害することが最も効果的に前立腺肥大を抑制する方法だと考えられている。

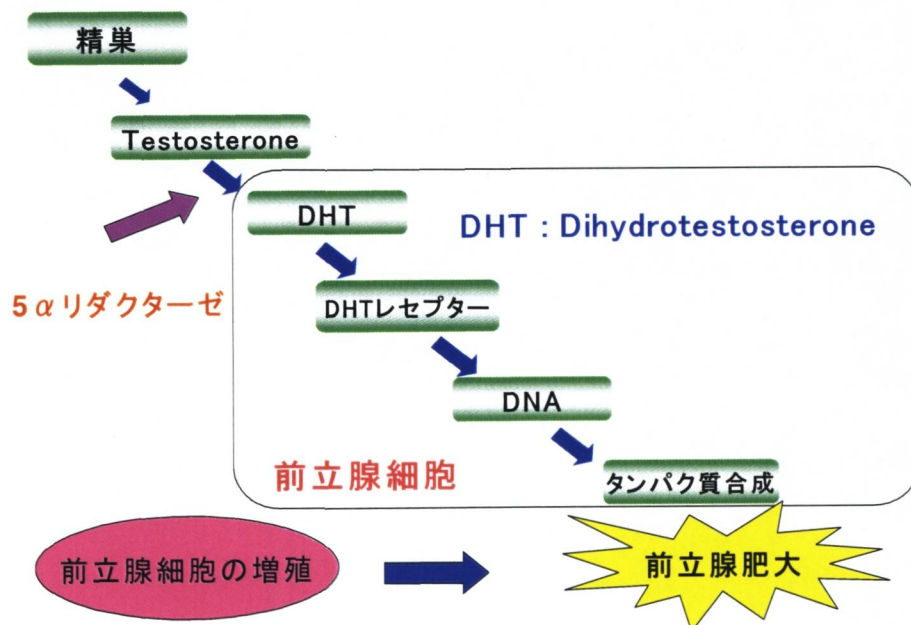


図3 男性ホルモン（アンドロゲン）が前立腺細胞に作用する経路

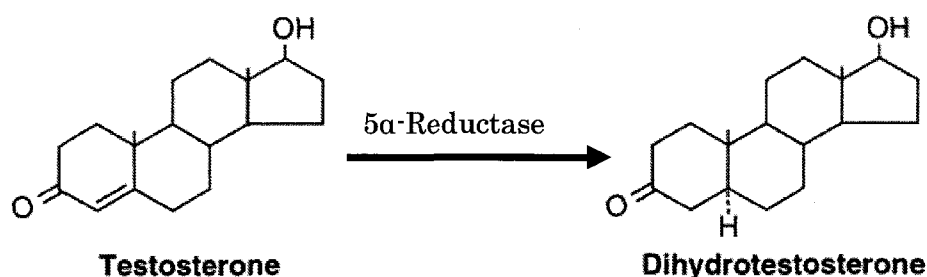


図4 Testosterone から Dihydrotestosterone (DHT) への変換

1-10 本研究の目的

現在までに、前立腺肥大症をはじめとした男性更年期障害に関する研究は少なくないが、それらの適切な治療法やメカニズムに関して明らかにされていない。このため男性更年期障害の標準的な診断と治療法は先進諸国においても未だ多様で確立していないのが現状である。現在、前立腺肥大抑制として使用されているものに医薬品では5 α -リダクターゼ阻害剤がある。しかしそれらを常時摂取するには副作用が懸念される。そこで必要とされているのが食経験豊富で安心して摂取できる食品による予防や改善なのだが、前立腺肥大を抑制する食品についての研究はあまり進められていないのが現状であり、自分に合った治療法やサプリメントを選ぶ選択肢が少ない。

そこで本研究では、食品による予防医学を実践することで人々のQOL(Quality Of Life、生活の質)を向上させる観点から[20]、天然由来の抽出物を用いてスクリーニングを行い、男性ホルモンを調節する作用を示すような新規食品素材の探索を目的として行うこととした。

第2章 実験系について

2-1 ホルモン作動性に関する研究方針

研究方針としては大きく分けて *in vivo* の系と *in vitro* の系に分けて評価を行うことにした。*in vivo* の系では、アンドロゲンによって雄動物の副生殖器（前立腺、精嚢腺等）が肥大することを利用して抽出物中の物質がアンドロゲン様作用を検出する試験法であるハーシュバーガーアッセイである[21]。成熟した個体ではホルモン様物質を投与しても内因性のアンドロゲンが存在するため、去勢によって視床下部 - 下垂体 - 精巣フィードバックをなくした個体を利用してホルモン様物質に対する反応性を高めている。また内因性のアンドロゲンをなくした状態の雄動物に既知量の外因性のアンドロゲン様物質を投与し、副生殖器を肥大させた状態で、抗アンドロゲン作用を有する物質を作用させることにより副生殖器重量の増加抑制が生じることを利用して抗アンドロゲン作用を検出することができる。本研究ではマウスを用いてこのハーシュバーガーアッセイを実施し、有望な食品素材のスクリーニングを行った。

一方、*in vitro* 試験として、アンドロゲン依存的に増殖する前立腺がん細胞 LNCaP 細胞をサンプル抽出物存在下で培養し、MTT 法で処理し 570 nm で吸光度を測定することにより細胞増殖への影響を評価することとした[22]。これらの試験結果により、サンプルの持つホルモン作動性を総合的に評価した。

2-2 試薬、その他

エタノール 特級 99.5% (和光純薬)、塩酸ケタミン (三共)、ドロペリゾール (三共)、Testosterone (和光純薬)、Dihydrotestosterone (和光純薬)、Flutamide (SIGMA)、Finasteride (和光純薬)、ノコギリヤシエキス (和光純薬)、ケルシトリン (SIGMA)、CS-FBS : 牛胎児血清 (GIBCO)、0.1%トリプシン-EDTA (GIBCO)、ジメチルスルホキシド (和光純薬)、PBS (-) : リン酸緩衝溶液*1、MTT (SIGMA) *2

* 1 リン酸緩衝液の調製

8.0 g の NaCl、2.9 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g の KCl および 0.2 g の KH_2PO_4 を純水 1 L に溶解し、高圧蒸気滅菌を行った[23]。

* 2 Thiazolyl Blue Tetra-zolium Bromide

2-3 実験動物の飼育と管理

実験動物は、日本エスエルシー株式会社から購入した雄の Std:ddy マウス (7~8 週齢、体重 28~31g) を用いた。マウスは飼育室にて、12 時間の昼夜サイクル (明期 8:00~20:00)、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、飼料と水は自由摂取という条件で飼育した[24]。飼料は日本農産工業株式会社製のラボ MR ストックを使用した。本研究では、実験動物の飼養及び保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号) を順守し、動物実験を行った。

2-4 前立腺肥大モデルマウスの作成

【実験方法】

本研究で用いた評価系はマウスに去勢手術を施し、精巣を摘出することで内因性のアンドロゲンの分泌を抑制し、Testosterone を一定量投与することで外因性アンドロゲン量をコントロールした実験モデルである。全身麻酔剤としては、塩酸ケタミン（ケタミンとして 2.5 mg/mouse）とドロペリゾール(0.125 mg/mouse)を用いた。マウスを陰嚢部より切開して精巣摘出手術（去勢）を施すことにより Testosterone を産生できない状態を作り出し、そこに 50mg/Kg の Testosterone を 10 日間腹腔内注射することにより、前立腺肥大モデルマウスを作り出した[25]。

また解剖と同時に精嚢腺を摘出し重量測定を行っているが、アンドロゲンはその作用において前立腺と精嚢腺とで同じような影響を及ぼすことがこれまでの研究からわかっている。今回の実験結果からは精嚢腺重量についても Testosterone の濃度に依存して重量が増加しているのが確認されており、精嚢腺に関してこれまでに報告されている内容[21]を再現することができた（図 5）。

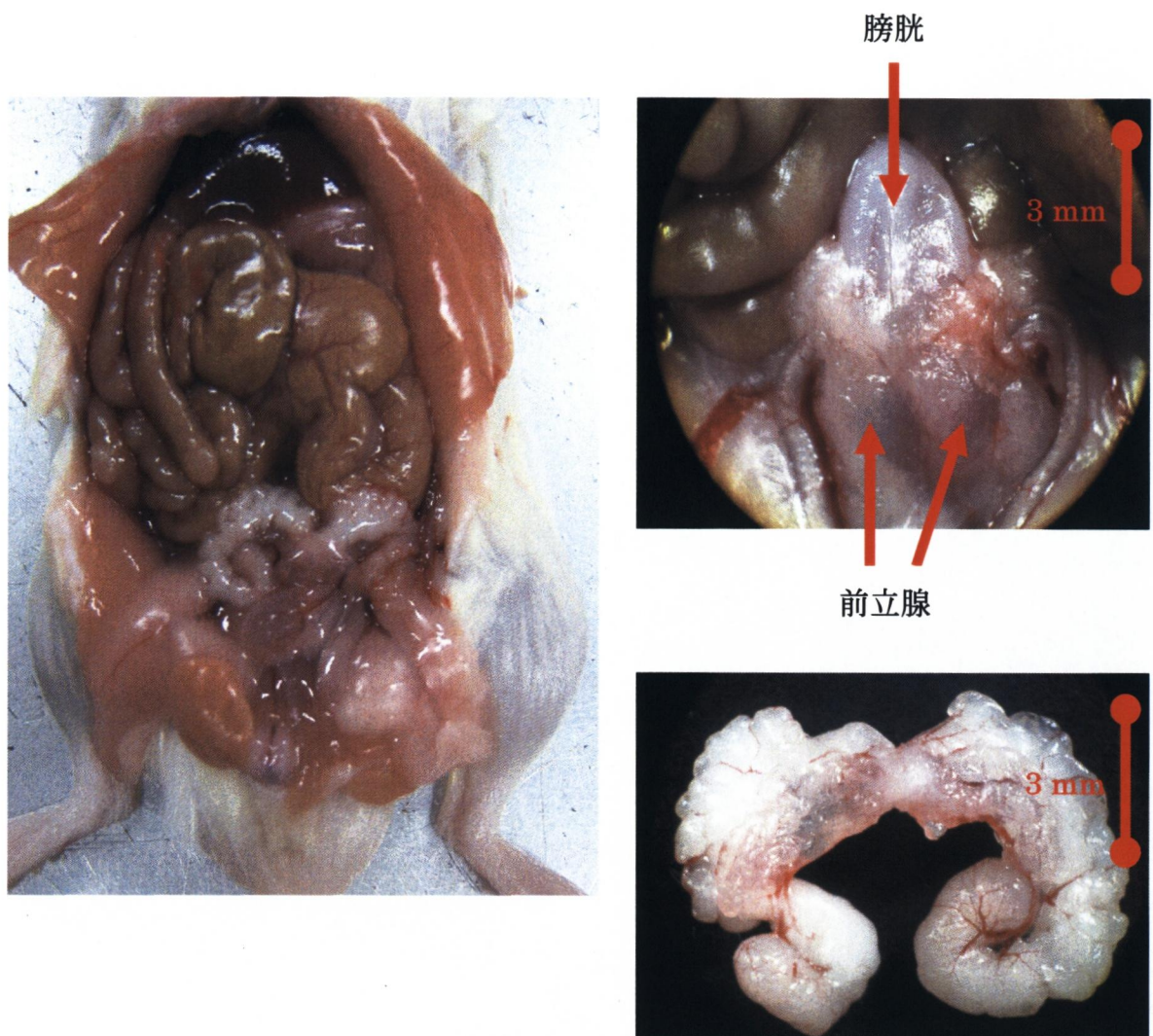


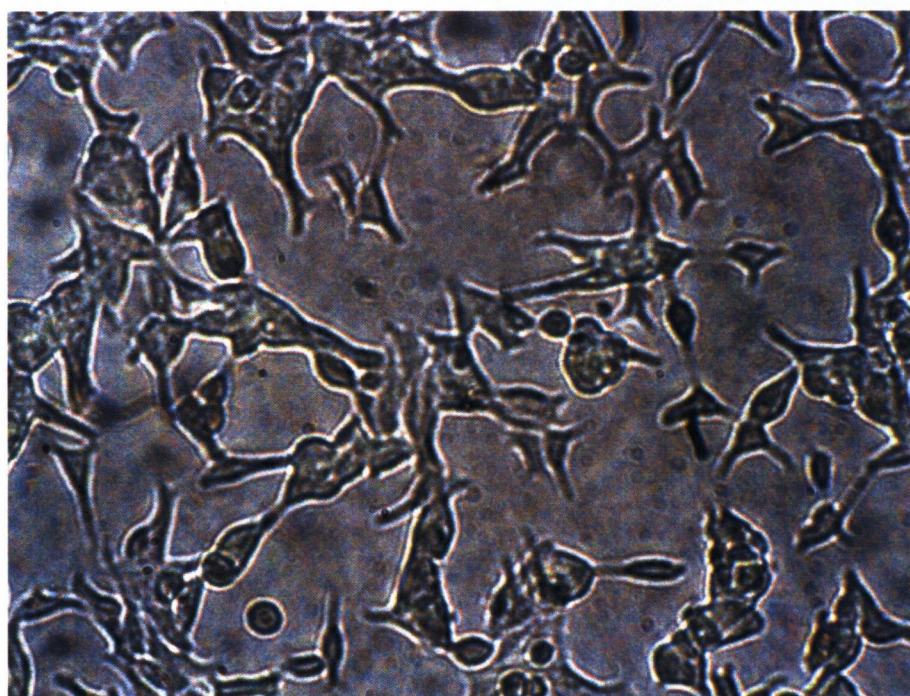
図5 雄マウスの解剖図

(左)マウス開腹図 (右上)膀胱と前立腺拡大図 (右下)精囊腺拡大図

前立腺は普段は膀胱の真下で脂肪組織に埋もれた状態で存在しており、またマウスの前立腺は非常に小さいため、摘出するのが困難であった。そのため顕微鏡を用いてマウスの前立腺の短径と長径の長さをノギスで測定することにより、前立腺の大きさを評価することにした。

2-5 LNCaP 細胞を用いての細胞増殖試験

ヒト前立腺癌細胞由来培養細胞株 LNCaP 細胞（図 6）を 5%ウシ胎児血清（FBS）を含む RPMI 1640 培地で培養した。細胞培養の方法に関してはこれまでに報告されている論文[22,29,30]を参考にして行った。LNCaP 細胞はアンドロゲン依存的に増殖する特徴があり、ステロイドホルモン関連の試験によく用いられる細胞である。通常実験において用いられる FBS には、わずかながらもステロイドホルモンが含まれている。そのため実際にステロイドホルモンの影響を検討する段階においては、通常使用する FBS の代わりにステロイドホルモンを活性炭処理により除去した FBS（charcoal stripped-FBS（CS-FBS））を使用した。LNCaP 細胞は、理化学研究所 バイオリソースセンターより提供されたものを用いた。



100 μm

図 6 ヒト前立腺癌細胞由来培養細胞株 LNCaP 細胞(培養 3 日目)

【実験方法】

滅菌済み 96 well plate (Corning Inc.) に LNCaP 細胞を 1×10^4 cell / well になるようにまき、そこへ Sample 抽出物を濃度が 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$ になるように添加した。同時に Testosterone を 1×10^{-10} mg/mL の濃度になるように添加した (図 7)。また Sample 抽出物を添加していないものを Control とした。この際、添加する血清としては通常使用する FBS ではなくステロイドホルモン類を除去してある CS-FBS を使用した。96 well plate への作業が終了した後に 37°C 、5% CO_2 の条件に保ったでインキュベーター内で 4 日間培養を行った。培養終了後に MTT assay により 96 well plate を処理し、570 nm での吸光度を測定することで細胞の増殖率を確認した[31]。

【MTT assay の操作方法】

1. MTT 試薬を PBS (－) で 5mg/ml に調製した。この試薬は細胞内に取り込まれ Formazan (ホルマザン) に変化する。
2. インキュベーターから 96 well plate を取り出した後、培養液を除去せずにすみやかに MTT 試薬を 20 μL ずつ各 well に添加した。
3. CO_2 インキュベーター (37°C 、5% CO_2) で約 1 時間培養した。
4. 培養後アスピレーターで培養液を吸い取り、Formazan を溶解させるため DMSO (ジメチルスルホキシド) 50 μL を各 well に添加してよくピペティングし、分光光度計を用いて 570 nm で吸光度を測定した。

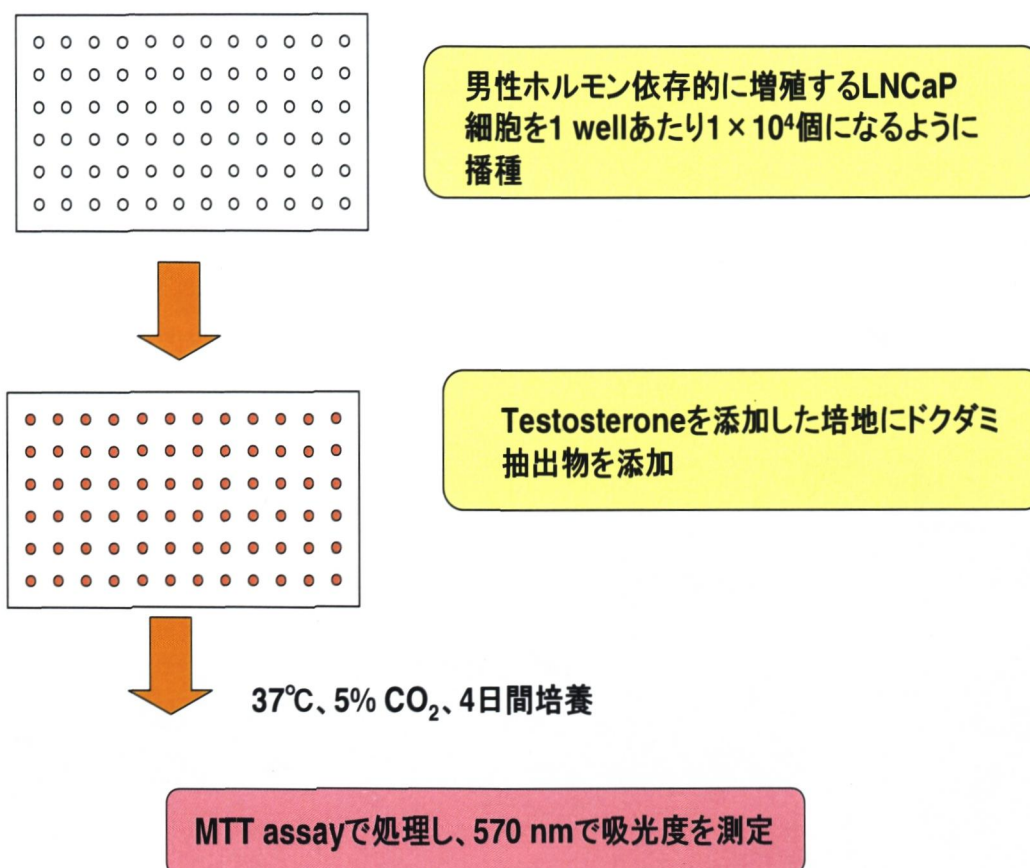


図7 LNCaP細胞を用いての細胞増殖試験方法

2-6 ドクダミとは

ドクダミ（学名 *Houttuynia cordata*）はドクダミ科、ドクダミ属の植物で、本州以南の日本各地、中国や台湾などのアジアに広く分布し、山野の樹陰や庭の湿地に野生する多年草である（図8）。また生のドクダミには強い特異臭があり、これはデカノイルアセトアルデヒド、ラウリールアルデヒドという臭気成分である。洗って日干しにしたものを別名十薬(ジュウヤク)という。ドクダミの薬理作用としては、抗菌作用、抗炎症作用、血管収縮作用、利尿作用、などが知られており解毒、湿疹などの皮膚疾患に用いられる。さらにドクダミの開花時期は5月下旬から6月頃で、この時期のドクダミはクエルシトリンという成分が最も多く含まれるため薬効が強いとされている。

ドクダミの成分の薬効成分

クエルシトリン・・・利尿・緩下作用、血圧調整、毛細血管の強化作用、消炎作用

デカノイルアセトアルデヒド・・・殺菌作用

クロロフィル・・・肉芽組織の再生促進

シス、トランス - *N*-（4-ヒドロキシスチリル）ベンザミン・・・血小板凝集抑制作用

カリウム・・・血圧調整、新陳代謝促進



図8 ドクダミ (*Houttuynia cordata*)

2-7 ドクダミの実験材料について

【ドクダミのメタノール抽出】

5月から10月に本大学の構内に自生しているドクダミを採取した。ドクダミの葉と花、茎の部分を水で洗いハサミで細かく刻んで、10倍量のメタノールに一晩浸漬し、ろ過して有機溶媒をエバポレーターにて減圧乾固したものを材料とした。本研究に使用したドクダミは6月、7月、9月に採取したものを用いた（収率約5%~10% g/g）。

第3章 ドクダミの抗アンドロゲン作用に関する研究

3-1 ドクダミ抽出物投与による前立腺肥大モデルマウスの抑制効果

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ抽出物の活性を評価した。マウスは1群8匹で以下のように3群に選別した。

A群：去勢

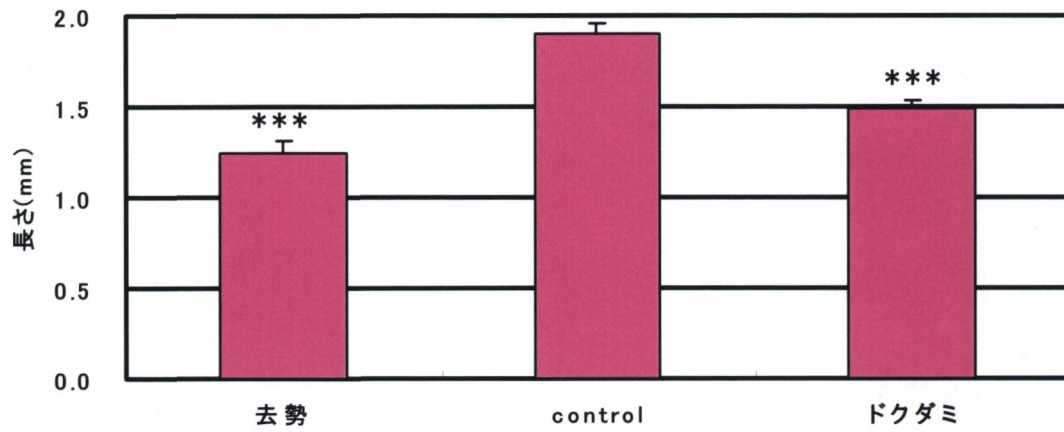
B群：去勢+Testosterone 50 mg/Kg (control)

C群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 100 mg/Kg

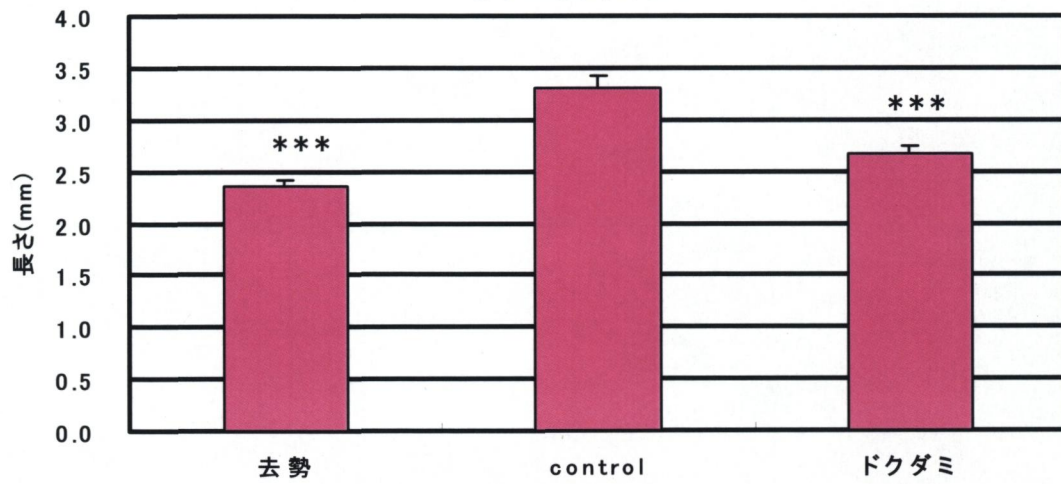
Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与した。精巣摘出の翌日より B、C の各群には Testosterone を、A 群に対してはコーン油 100 μ l を腹腔内注射した。また同時に C 群に対してはドクダミ抽出物を 2 週間経口投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径をノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群と比較して、前立腺短径と長径ともにドクダミ投与群において有意に前立腺の肥大が抑制されていることが観察された (図 9)。また精囊腺重量に関しては、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/kg を腹腔内投与した control 群が 3.31 ± 0.34 g/Kg of B.W だったのに対してドクダミ投与群では 2.19 ± 0.18 g/Kg of B.W という結果であった (図 9)。

前立腺短径



前立腺長径



精囊腺重量

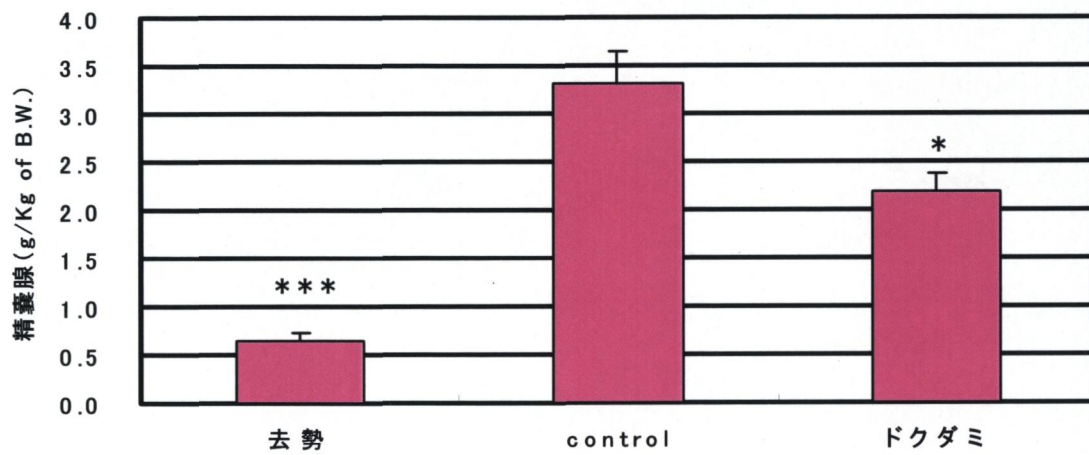


図9 ドクダミ抽出物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.005$ vs Control

3-2 ドクダミ抽出物の投与量検定実験

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ抽出物の活性を評価した。マウスは1群5匹で以下のように6群に選別した。

A 群：去勢

B 群：去勢+Testosterone 50 mg/Kg (control)

C 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 5 mg/Kg

D 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 20 mg/Kg

E 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 100 mg/Kg

F 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 500 mg/Kg

Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与した。精巣摘出の翌日より B、C、D、E、F の各群には Testosterone を、A 群に対してはコーン油 100 μ l を腹腔内注射した。また同時に C 群から F 群に対してはそれぞれの投与量のドクダミ抽出物、2 週間経口投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群と比較して、ドクダミ抽出物投与群においては前立腺短径・長径で大きな差は無いが前立腺肥大抑制傾向が観察された。また精囊腺重量に関しては、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群が 2.60 ± 0.15 g/Kg of B.W だったのに対してドクダミ抽出物投与群では投与量 5 mg/Kg では 1.95 ± 0.17 g/Kg of B.W.、20 mg/Kg では 1.93 ± 0.09 g/Kg of B.W.、100 mg/Kg では 1.74 ± 0.12 g/Kg of B.W.、500 mg/Kg では 1.48 ± 0.17 g/Kg of B.W.という結果であり、control 群と比較してドクダミ抽出物投与群で用量依存的に精囊腺の重量に減少がみられた (図 10)。

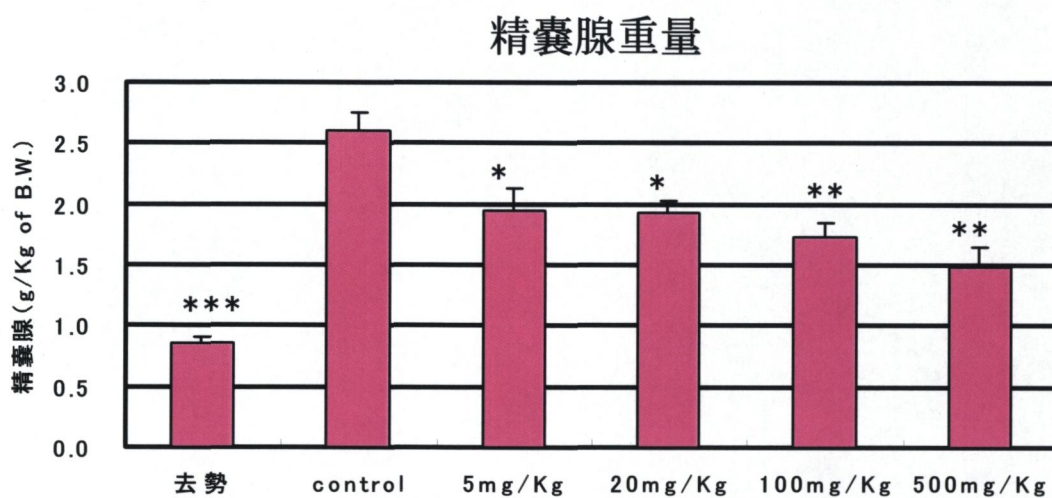
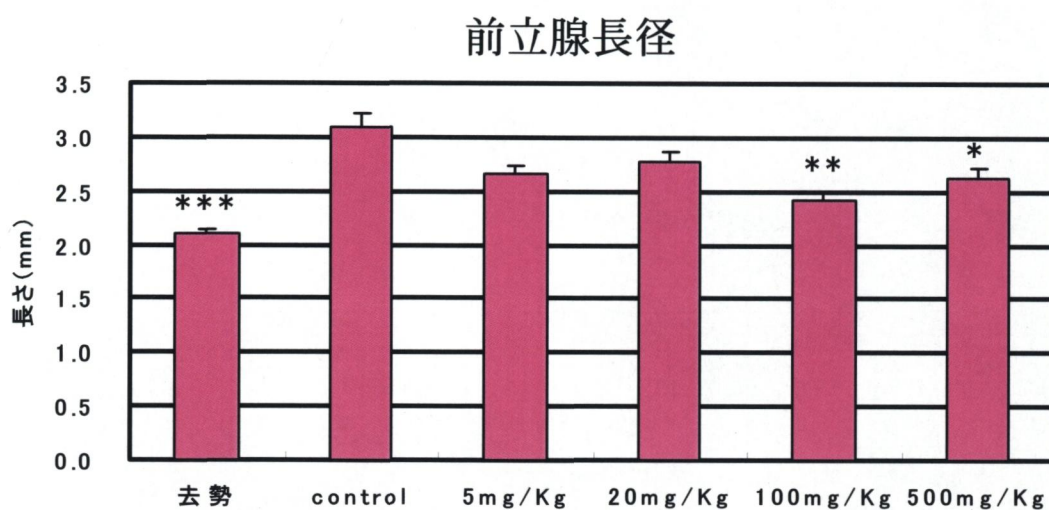
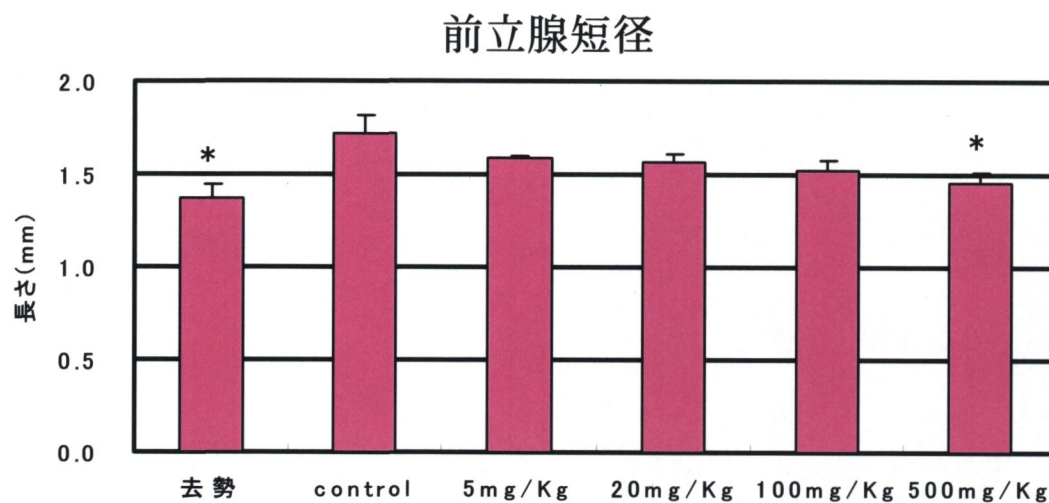


図 10 ドクダミ抽出物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.005$ vs Control

3-3 ドクダミ抽出物の抽出方法の違いによる投与実験

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ抽出物の活性評価を行った。マウスは1群6匹で以下のように5群に選別した。

A 群：去勢

B 群：去勢+Testosterone 50 mg/Kg (control)

C 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物(北海道産 MeOH 抽出) 100mg/Kg

D 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 (構内 MeOH 抽出) 100mg/Kg

E 群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 (構内 EtOH 抽出) 100 mg/Kg

Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与した。精巣摘出の翌日より B、C、D、E、の各群には Testosterone を、A 群に対してはコーン油 100 μ l を腹腔内注射した。また同時に C 群、D 群、E 群に対してはそれぞれのサンプルを2週間経口投与した。

またサンプルの C 群は北海道で採取したドクダミをメタノール抽出したものを北海道産ドクダミメタノール抽出物として投与した。D 群は本大学の構内で採取したドクダミをメタノール抽出したものを構内ドクダミメタノール抽出物として投与した。E 群は本大学の構内で採取したドクダミをエタノール抽出したものを構内ドクダミエタノール抽出物として投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群と比較して、北海道産ドクダミメタノール抽出物投与群においては前立腺では有意な肥大抑制はされていなかったが、精囊腺重量が有意に減少していた。一方、構内ドクダミメタノール抽出物投与群においては、前立腺短径と長径ともに control 群と比較して有意な前立腺肥

大抑制作用が確認された（図 1 1）。また精囊腺重量に関しても有意な精囊腺重量が減少していた。また構内のドクダミエタノール抽出物投与群は前立腺においては前立腺肥大抑制傾向は見られるが、精囊腺重量が有意に減少していた。これよりエタノール抽出物よりメタノール抽出物のほうが活性が強いと考えられる。去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した Control 群が 2.29 ± 0.09 g/Kg of B.W. だったのに対して北海道産ドクダミメタノール抽出物投与群では 2.22 ± 0.04 g/Kg of B.W、構内ドクダミメタノール抽出物投与群では 2.12 ± 0.04 g/Kg of B.W、構内ドクダミエタノール抽出物投与群では 2.48 ± 0.08 g/Kg of B.W であり、control 群と比較してそれぞれのドクダミ抽出物投与群で有意差がみられた（図 1 1）。

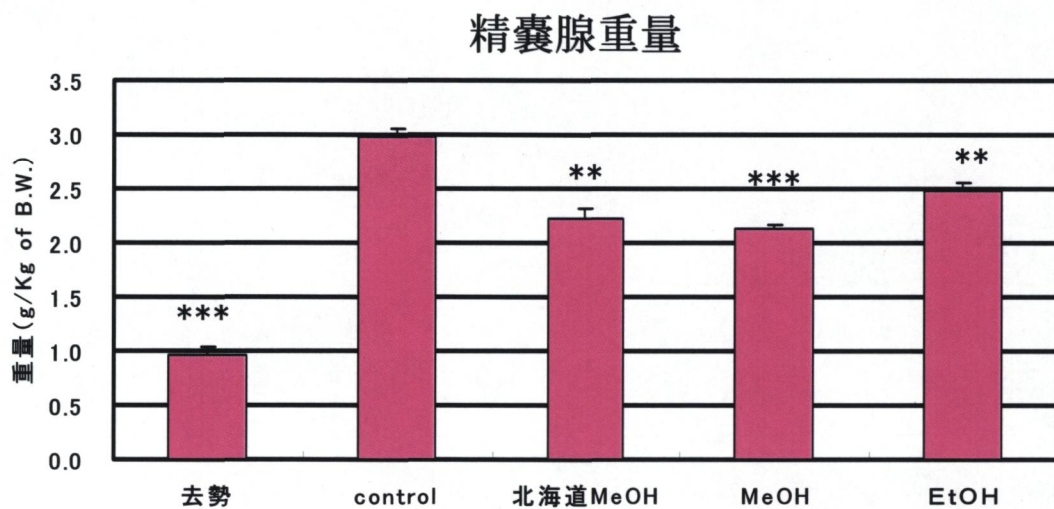
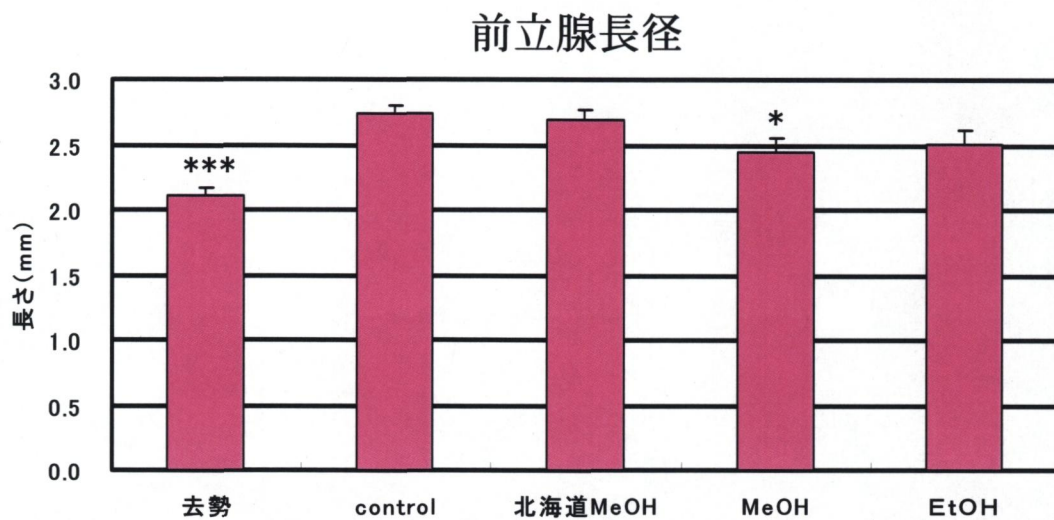
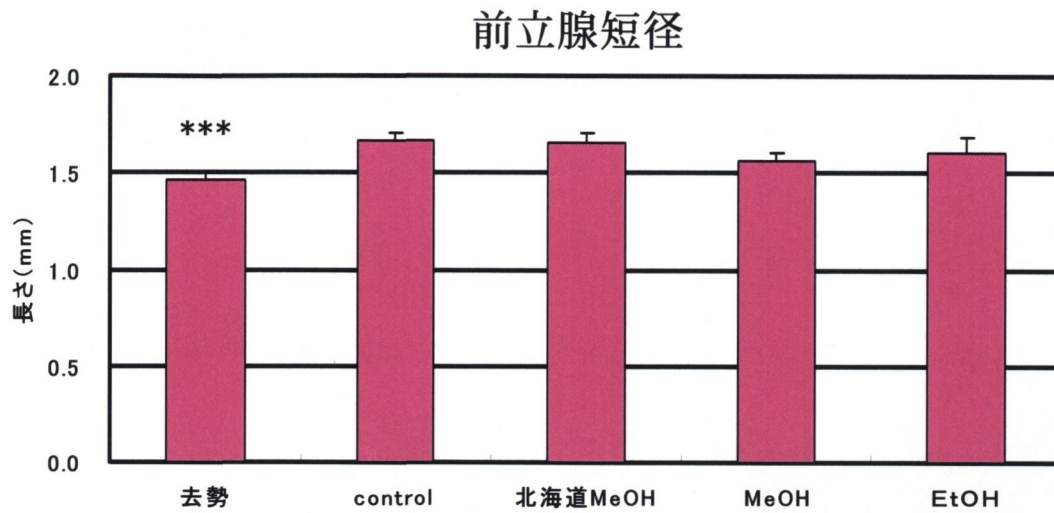


図 1 1 ドクダミ抽出物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.005$ vs Control

3-4 ドクダミ抽出物のポジティブコントロールとの比較実験

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ抽出物の活性評価を行った。マウスは1群5匹で以下のように5群に選別した。

去勢： 去勢

control： 去勢+Testosterone 50 mg/Kg

ドクダミ： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 100mg/Kg

SP： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ノコギリヤシエキス 100 mg/Kg

PP： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ペポカボチャ種子抽出物 100 mg/Kg

Flu： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+Flutamide 10mg/Kg

Fina： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+Finasteride 10mg/Kg

Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与した。精巣摘出の翌日より control、ドクダミ、SP、PP、Flu、Fina の各群には Testosterone を、去勢群に対してはコーン油 100 μ L を腹腔内注射した。また同時にドクダミ群に対してはドクダミ抽出物、SP 群に対してはノコギリヤシエキス、PP 群に対してはペポカボチャ種子抽出物、Flu 群に対しては Flutamide、Fina 群に対しては Finasteride を2週間経口投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群と比較して、前立腺長径ではすべてのサンプル投与群において有意な抑制傾向は見られた。精囊腺重量ドクダミ抽出物、また医薬品である Flutamide、Finasteride に有意な前立腺肥大抑制が見られた。

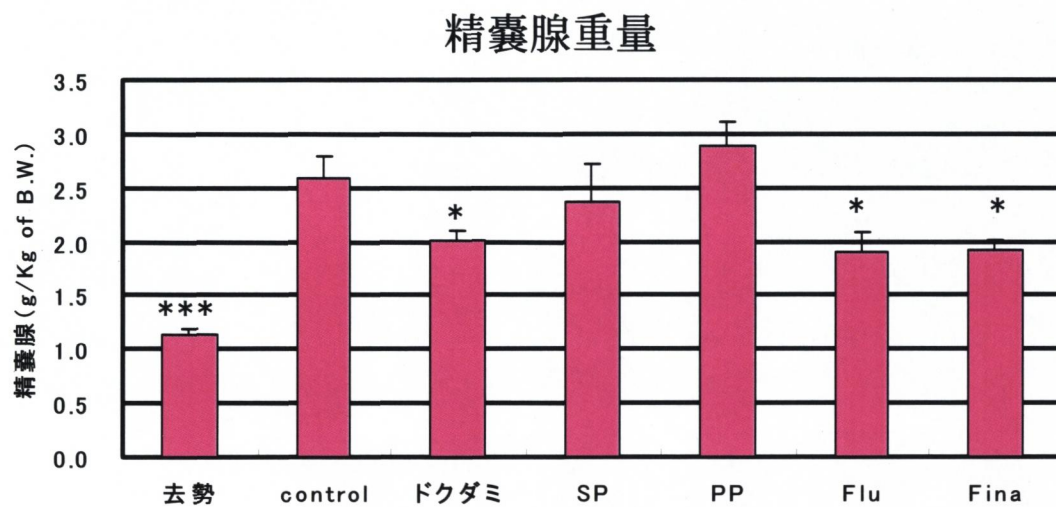
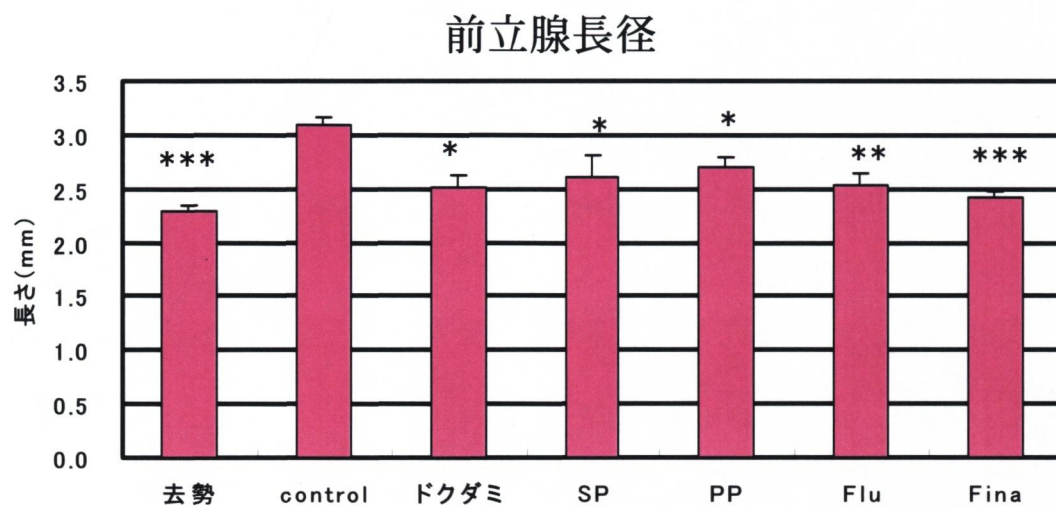
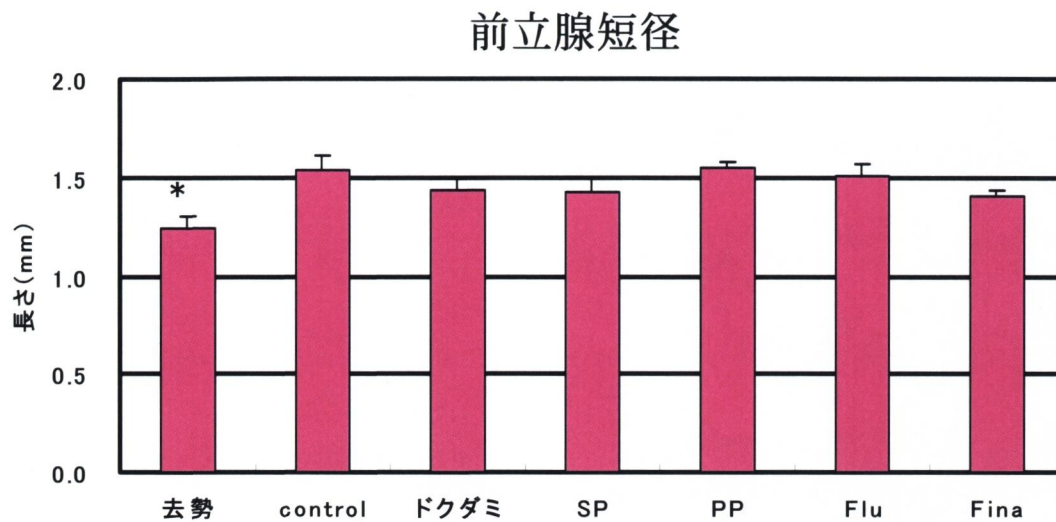


図 1 2 ドクダミ抽出物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.005$ vs Control

SP:ノコギリヤシ PP:ペボカボチャ Flu:Flutamide Fina:Finasteride

3-5 ケルシトリン投与実験

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ抽出物の活性評価を行った。マウスは1群6匹で以下のように5群に選別した。

去勢： 去勢

control： 去勢+Testosterone 50 mg/Kg

ドクダミ： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 100 mg/Kg

SP： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ノコギリヤシエキス 100 mg/Kg

QC： 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ケルシトリン 33 mg/Kg

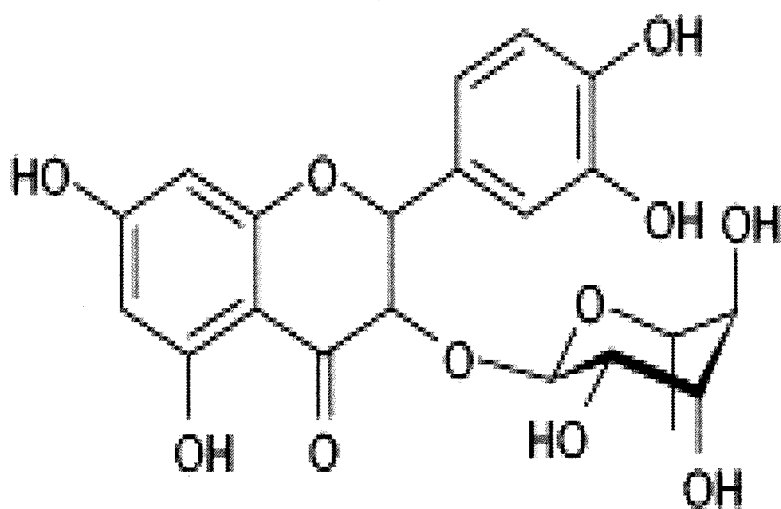
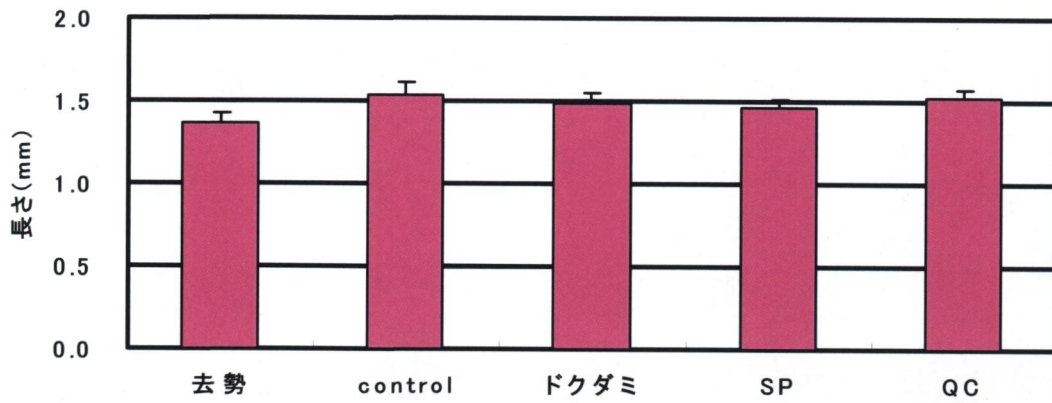


図13 ケルシトリンの構造式

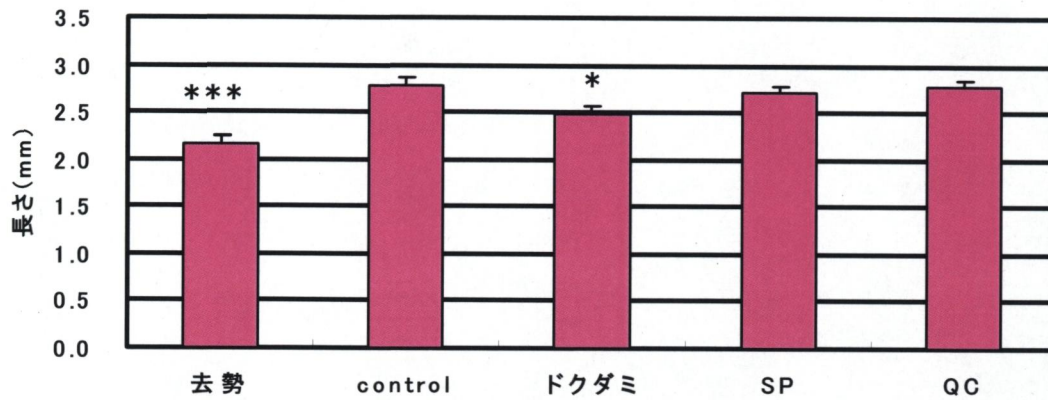
Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与した。精巣摘出の翌日より control、ドクダミ、SP、QC の各群には Testosterone を、去勢群に対してはコーン油 100 μ L を腹腔内注射した。また同時にドクダミ群に対してはドクダミ抽出物、SP 群に対してはノコギリヤシエキス、QC 群に対してはケルシトリンを 2 週間経口投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群と比較して、前立腺長径ではドクダミ抽出物投与群において有意な抑制作用が見られた。精囊腺重量においてはドクダミ抽出物、またドクダミの成分の一つであるケルシトリンに有意な前立腺肥大抑制が見られた。

前立腺短径



前立腺長径



精囊腺重量

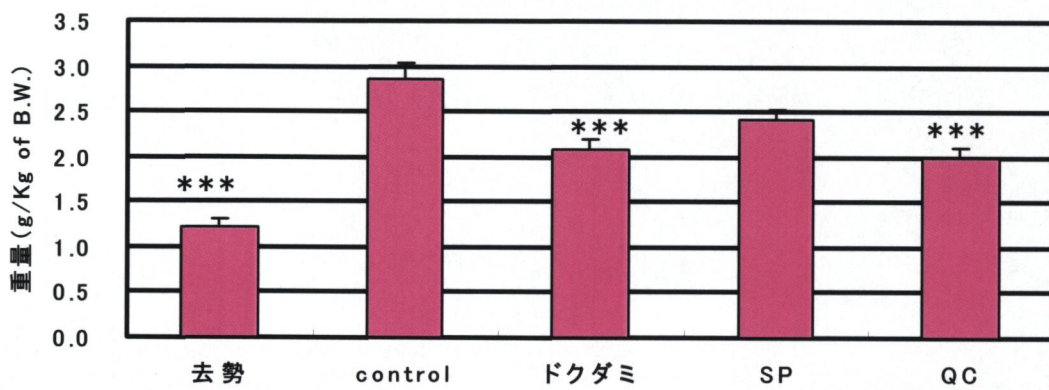


図14 ドクダミ抽出物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.005$ vs Control

SP: ノコギリヤシ QC: クエルシトリン

3-6 非去勢マウスを用いた前立腺肥大モデルに及ぼす影響

去勢手術を行わない正常なマウスを用いてドクダミ抽出物の活性を評価した。この実験ではマウスは1群5匹で以下のように5群に選別した。

A 群：正常

B 群：ドクダミ抽出物 100 mg/Kg

C 群：Testosterone 50 mg/Kg

D 群：Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ抽出物 100 mg/Kg

E 群：Testosterone 50 mg/kg+Flutamide 10 mg/Kg

Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ L に溶かしたのちに、コーン油 90 μ L を加えて調製したもの 100 μ L を投与した。投与開始日より B、C、D の各群において各 Sample を、E 群では Positive Control として Flutamide を経口投与した。同時に、C、D、E 群において Testosterone をコーン油に溶かしたものを3日に1回腹腔内投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、正常マウスと比較してドクダミ抽出物投与群は前立腺短径に有意な抑制作用が見られ、前立腺長径と精囊腺重量においては抑制傾向が見られた。正常マウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した群と比較して、Flutamide 投与群において有意に精囊腺重量が減少していた。しかし一方、正常マウスに3日に1回 Testosterone 投与を行っても、前立腺長径・長径と精囊腺重量は正常と比較してほとんど差はみられなかった（図15）。また今回 Positive Control として用いた Flutamide 投与群では群 Testosterone 投与群と比較して有意差はみられたものの、予想したよりも前立腺の大きさでは肥大抑制作用は緩和であった。

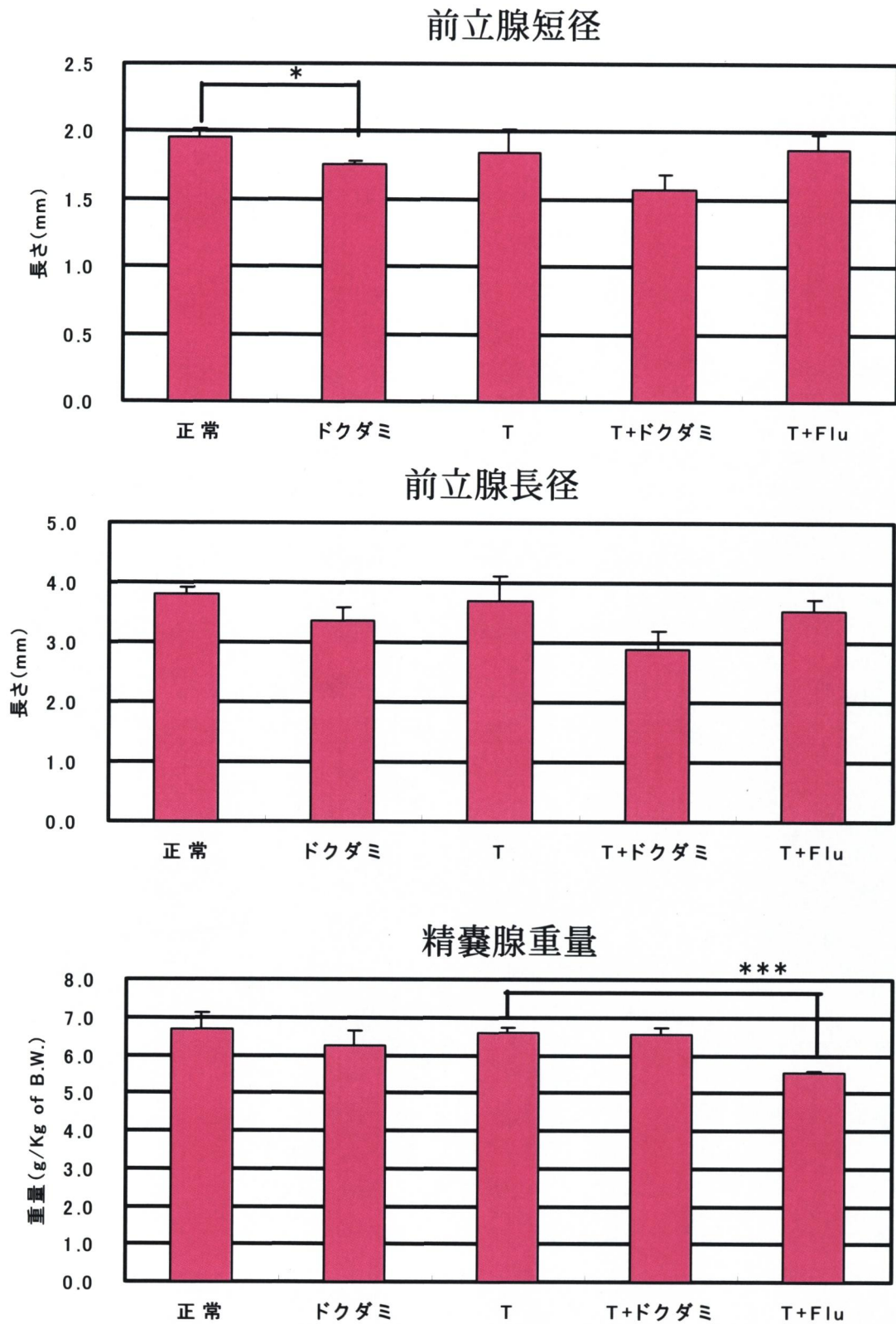


図 1 5 非去勢マウスを用いたドクダミ抽出物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.005$

T: Testosterone Flu: Flutamide

第4章 ドクダミの抗アンドロゲン作用におけるメカニズム解明

4-1 Testosterone 添加による LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響

LNCaP 細胞を用いてドクダミ抽出物の活性を評価した結果を図16に示した。ドクダミ抽出物により濃度依存的に Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加が抑制された。また Positive Control として Flutamide を添加した場合にも、Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加が顕著に抑制された。

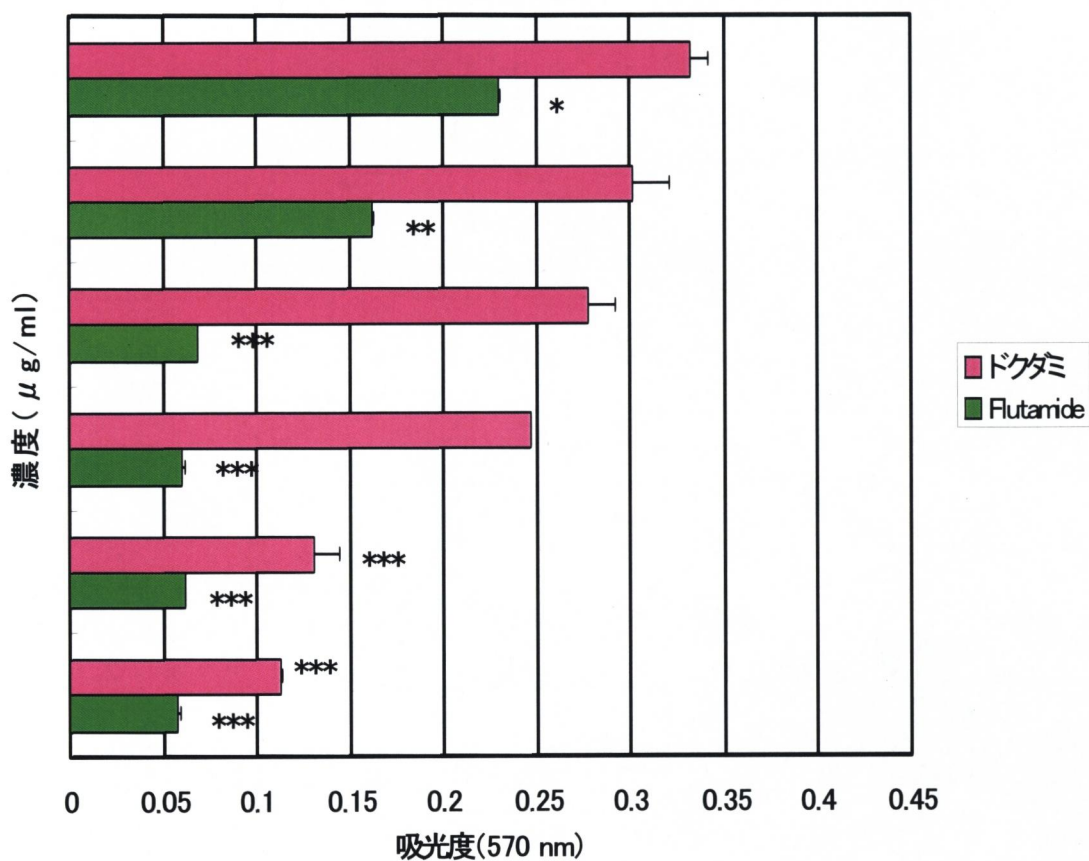
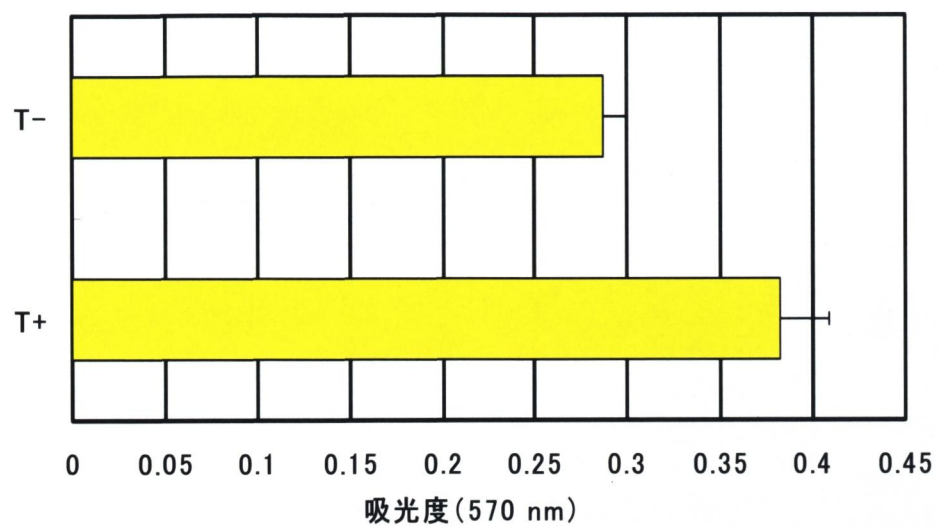


図 1 6 ドクダミ抽出物添加が Testosterone による
LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響

Each value represents mean \pm S.E. * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.005$ vs T+.

4-2 DHT 添加による LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響

図 1 6 に示した前回の実験では LNCaP 細胞を用いてドクダミ抽出物の活性を評価したところ、ドクダミ抽出物を添加した場合には Testosterone を加えた LNCaP 細胞の増殖を濃度依存的に抑えた。また図 1 7 に示したとおりドクダミ抽出物を Dihydrotestosterone (DHT) を添加した LNCaP 細胞に加えた場合も濃度依存的に細胞増殖を抑えていた。つまり Testosterone 添加、DHT 添加に関わらず、ドクダミ抽出物添加により有意に LNCaP 細胞の細胞数の増加を抑えるような結果が観察された。また Positive Control として Flutamide を添加した場合にも同様に、Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加が顕著に抑制された (図 1 7)。

ドクダミ抽出物は濃度依存的に Testosterone 添加による LNCaP 細胞増殖を抑制したこと、ドクダミ抽出物は濃度依存的に DHT 添加による LNCaP 細胞増殖を抑制したことから、ドクダミ抽出物の作用点は Testosterone から DHT に変換する 5α リダクターゼの阻害ではなく Flutamide と同様の DHT とレセプターの結合阻害であることがわかった。

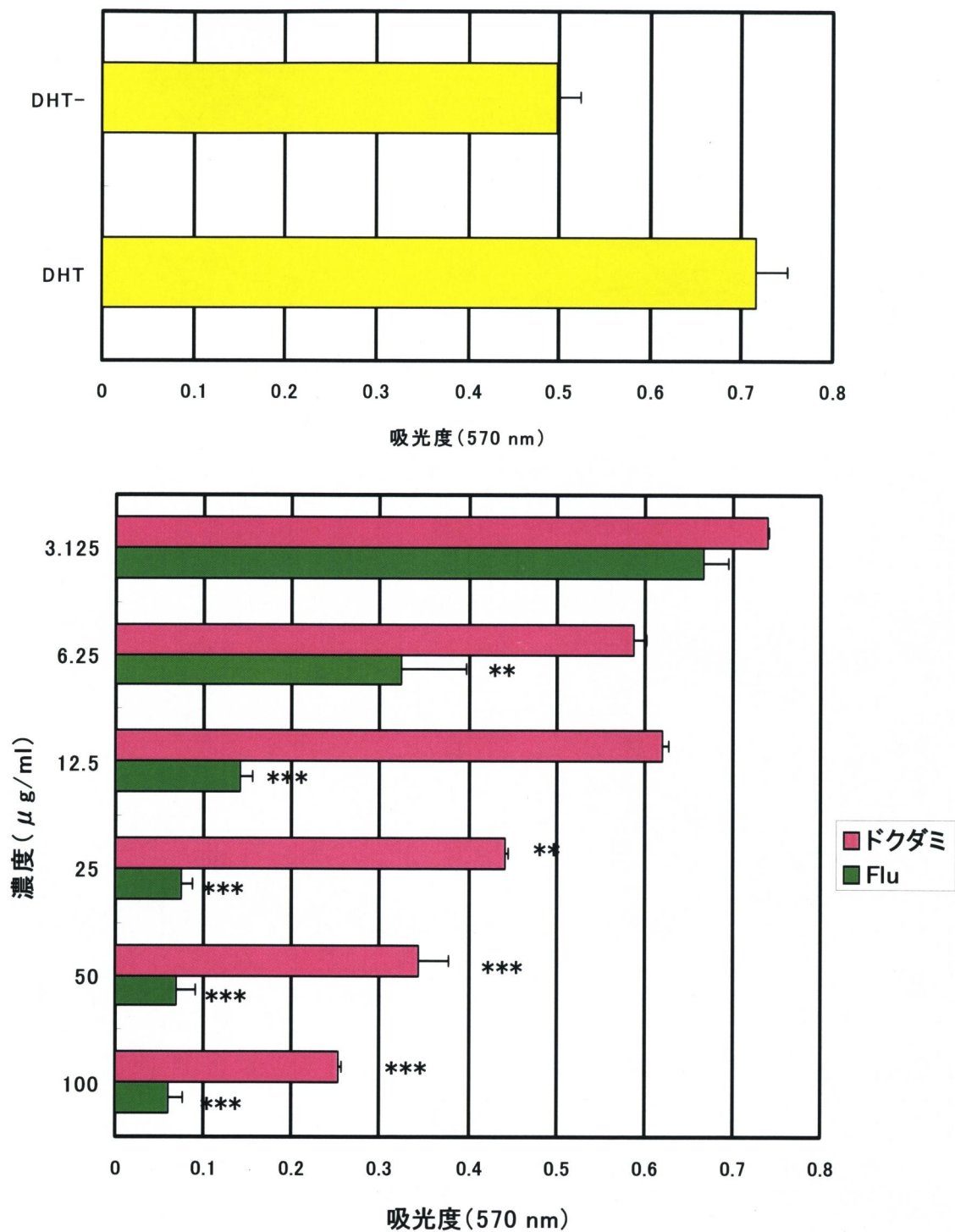


図 1 7 ドクダミ抽出物添加が DHT による LNCaP 細胞
増殖に及ぼす影響

Each value represents mean \pm S.E. ** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.005$ vs DHT+.

第5章 ドクダミ抽出物の分画

5-1 概要

マウスにおける前立腺肥大抑制作用および、LNCaP 細胞増殖に及ぼす影響を指標としてドクダミ抽出物の活性成分の分離を行った。活性成分を同定するために、まずドクダミメタノール抽出物を二液分配法によって酢酸エチル層、水層に分画してドクダミメタノール抽出物 20 g を酢酸エチルと水を入れた分液漏斗を使用して、同様の過程を 2 度繰り返し、上層の酢酸エチル層と下層の水層を分取し、二つのフラクションに分画した。純度の高い画分を得るために、分画した酢酸エチル層は再度の 90%メタノールとよく混合させ上層のヘキサン層と下層の 90%メタノール層に分画した。さらに水層を水とよく混合させ上層のブタノール層と下層の水層に分画した。ここで得られた分画物をマウスに投与し、抗アンドロゲン作用に関する試験を行うこととした。

ドクダミメタノール抽出物 20 g からヘキサン画分 1.51 g、90%メタノール画分 4.2 g、ブタノール画分 2.29 g、水画分 3.5 g を得た。分画後全ての画分は -20°C で保存して実験に用いた。

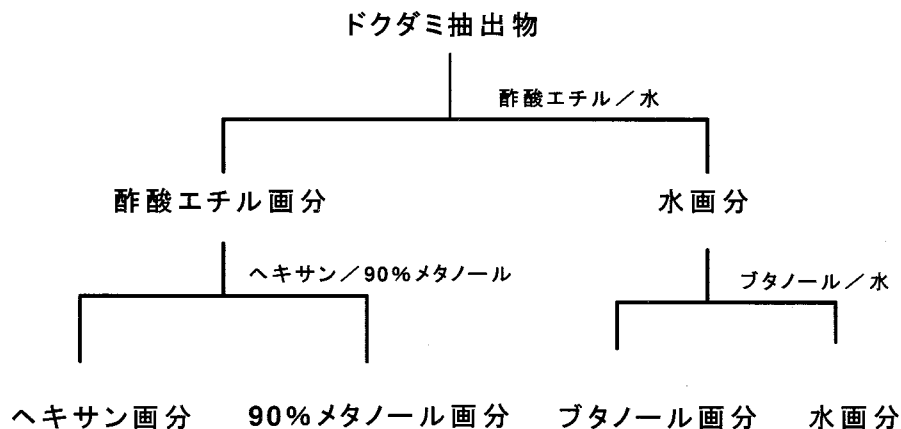


図18 分画スキーム

5-2 ドクダミ分画物投与のマウス前立腺に及ぼす影響

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ分画物(ヘキサン画分、90%メタノール画分、ブタノール画分、水画分)の活性評価を行った。マウスは1群5匹で以下のように5群に選別した。投与量は分画で得られた分画物の1/10量を投与した。

A群：去勢

B群：去勢+Testosterone 50 mg/Kg (Control)

C群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ ヘキサン画分 50 mg/Kg

D群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ 90%メタノール画分 150 mg/Kg

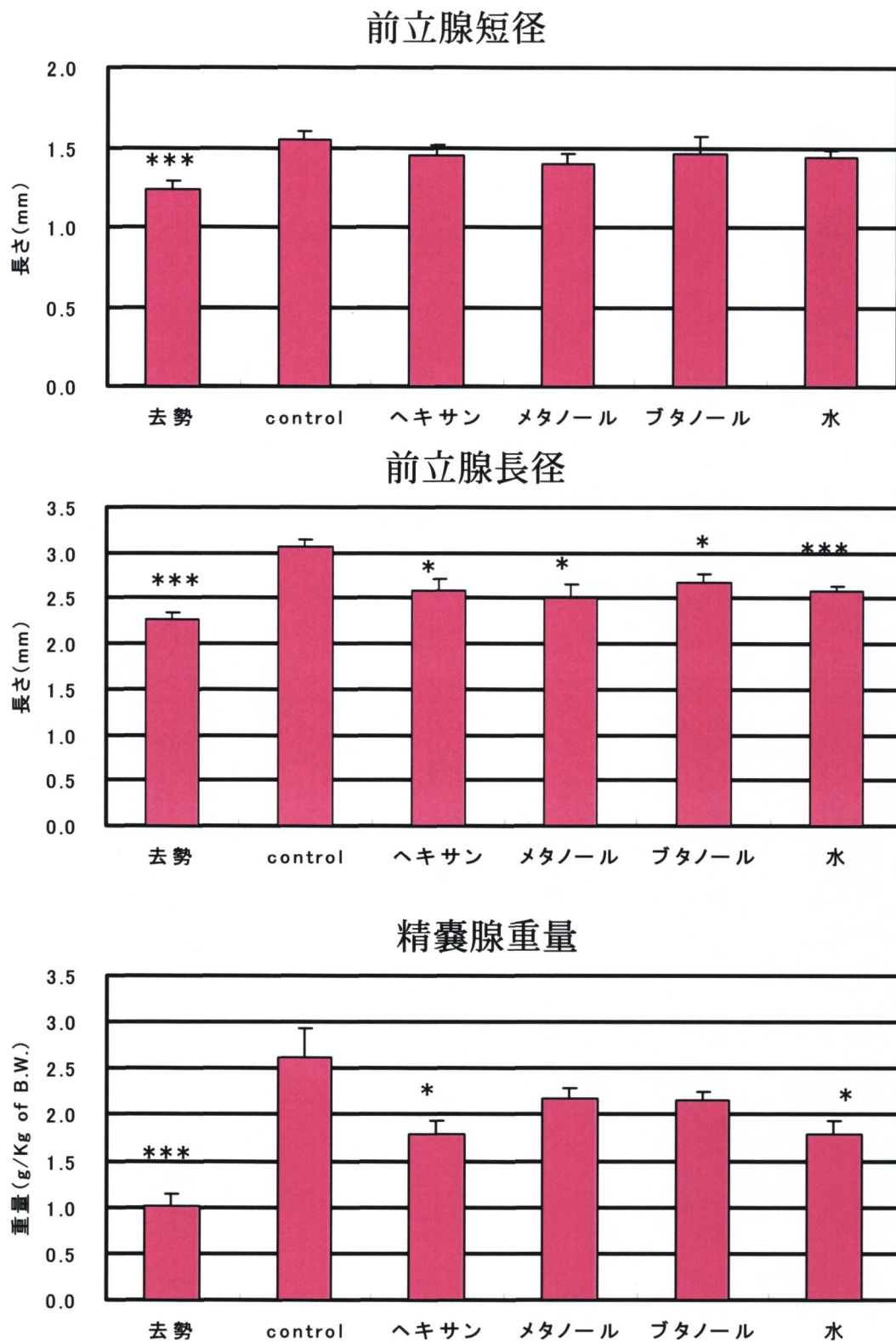
E群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ ブタノール画分 80 mg/Kg

F群：去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ 水画分 120 mg/Kg

Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与することにした。精巣摘出の翌日より B、C、D、E、F の各群には Testosterone を、A 群に対してはコーン油 100 μ l を腹腔内注射した。また同時に C 群に対してはドクダミヘキサン画分、D 群に対してはドクダミ 90%メタノール画分、E 群に対してはドクダミブタノール画分、F 群に対してはドクダミ水画分を2週間経口投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した Control 群と比較して、有意差は無いものの前立短径においても前立腺の肥大の抑制傾向が観察された。しかし一方、前立腺長径においては、Control 群と比較してすべてのサンプル投与群において有意な肥大抑制作用が見られた(図19)。また精囊腺重量に関しては、ドクダミ抽出物ヘキサン画分と水画分投与群においては精囊腺重量で有意な抑制がみられた。去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した Control 群の体重あたりの精囊腺重量

は 2.62 ± 0.31 g/Kg of B.W だったのに対してドクダミヘキサン画分投与群では 1.84 ± 0.20 g/Kg of B.W、ドクダミ水画分投与群では 1.79 ± 0.15 g/Kg of B.W という結果であり、ヘキサン画分と水画分ともに Control 群と比較して有意な増加抑制がみられた（図 19）。



s

図19 ドクダミ分画物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.005$ vs Control

5-3 ドクダミ分画物 (fr.1~fr.4) 添加の LNCaP 細胞に及ぼす影響

LNCaP 細胞を用いてドクダミヘキササン分画物の活性評価を行った。ドクダミ抽出物を添加しない (T+) を control 群とし、ドクダミヘキササン分画物 (fr.1、fr.2、fr.3、fr.4) を添加し、最終濃度が 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$ になるようにした。その結果ドクダミ抽出物を添加しない (T+) に比べて fr.4 において有意に Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加を抑えるような結果となった。一方、fr.1、fr.2、fr.3 添加群では Testosterone を添加したのみの Control 群と比較してとくに LNCaP 細胞数に差はみられなかった (図 2 1)。よって fr.4 をさらに分画を進めることにした。

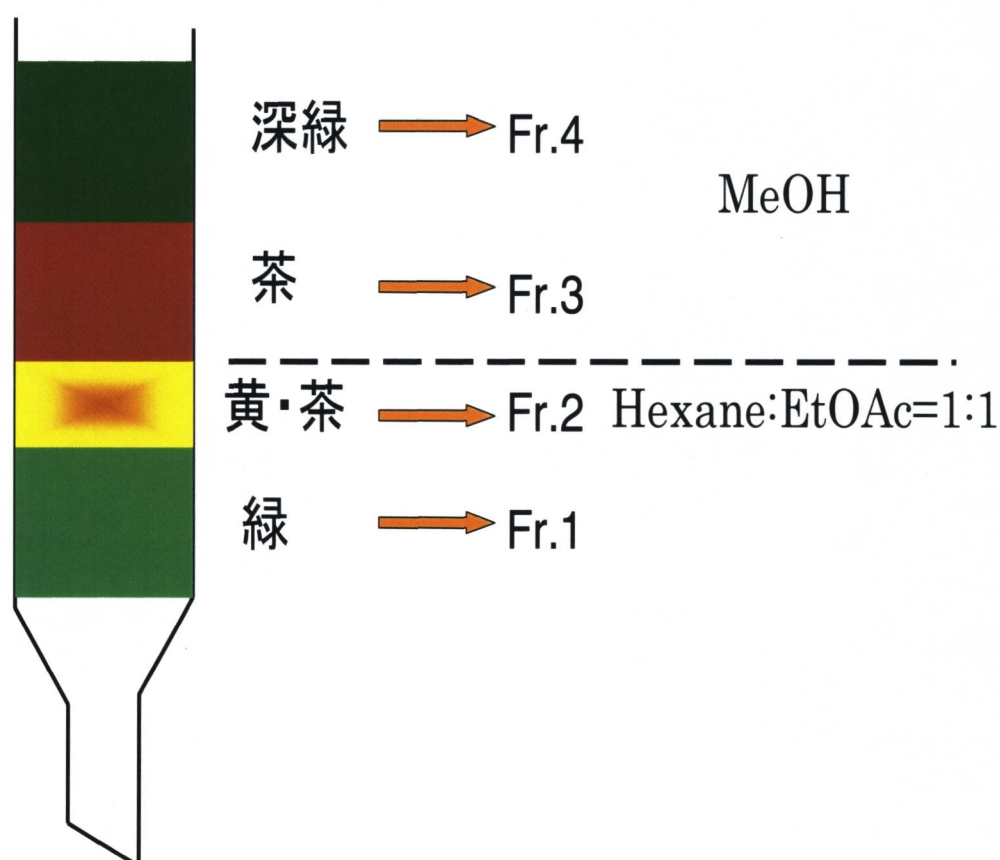


図 2 0 ドクダミメタノール抽出物 Hexane 画分の分画方法

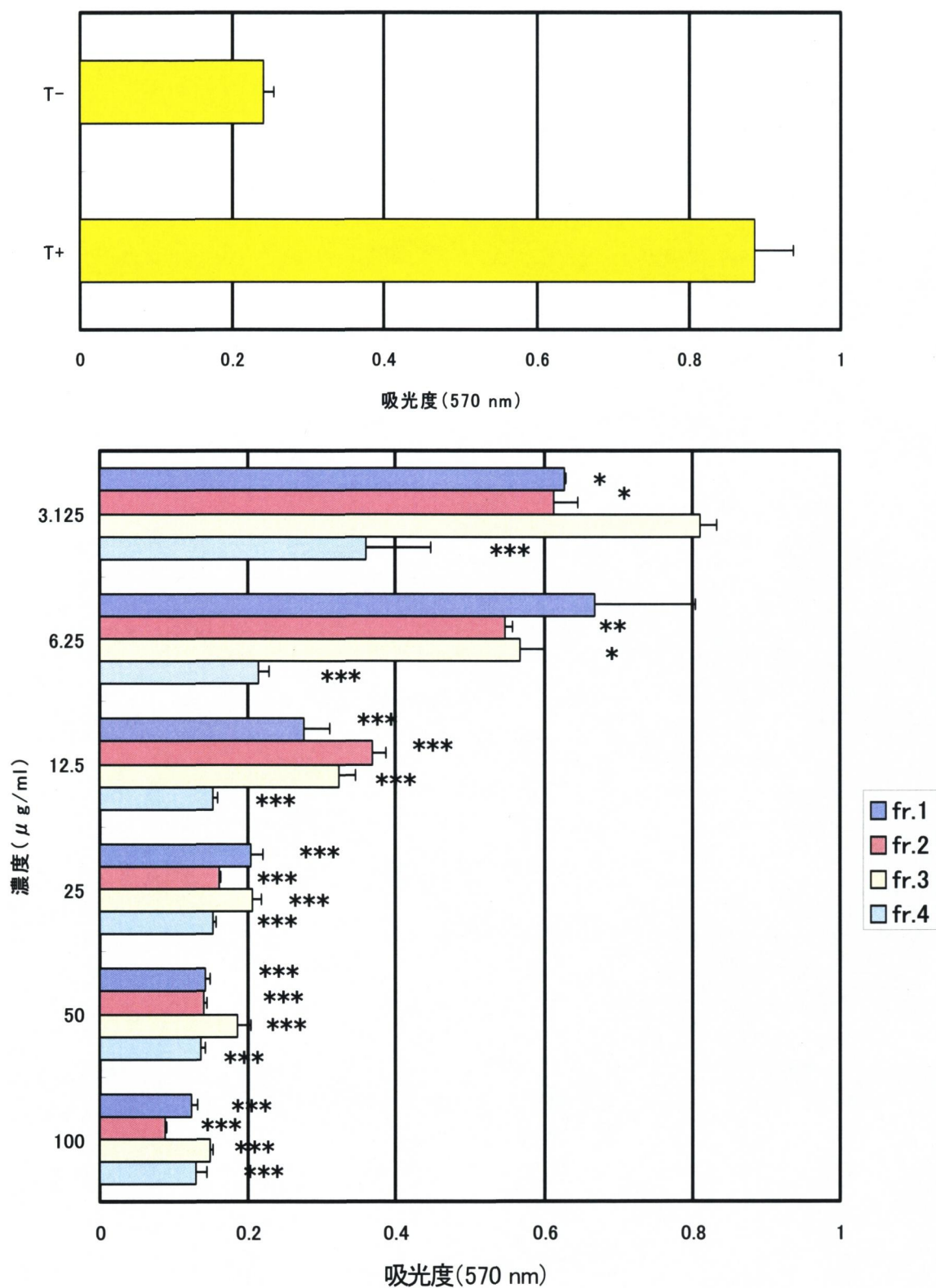


図 2 1 ドクダミ分画物添加による LNCaP 細胞に及ぼす影響

Each value represents mean \pm S.E. *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.005 vs T+.

5-4 ドクダミ分画物 (fr.4-1~fr.4-3) 添加の LNCaP 細胞に及ぼす影響

LNCaP 細胞を用いてドクダミヘキサン分画物の活性評価を行った。ドクダミ抽出物を添加しない (T+) を control 群とし、ドクダミヘキサン分画物 fr.4-1、fr.4-2、fr.4-3 を添加し濃度が 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$ になるようにした。その結果ドクダミ抽出物を添加しない (T+) に比べて fr.4-1、fr.4-2 において有意に Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加を抑えた。一方、fr.4-3 添加群では Testosterone を添加したのみの Control 群と比較してとくに LNCaP 細胞数に差はみられなかった (図 2 3)。しかし fr.4-1 のほうが fr.4-2 よりも細胞増殖抑制が強かったため、fr.4-1 をさらに分画することにした。

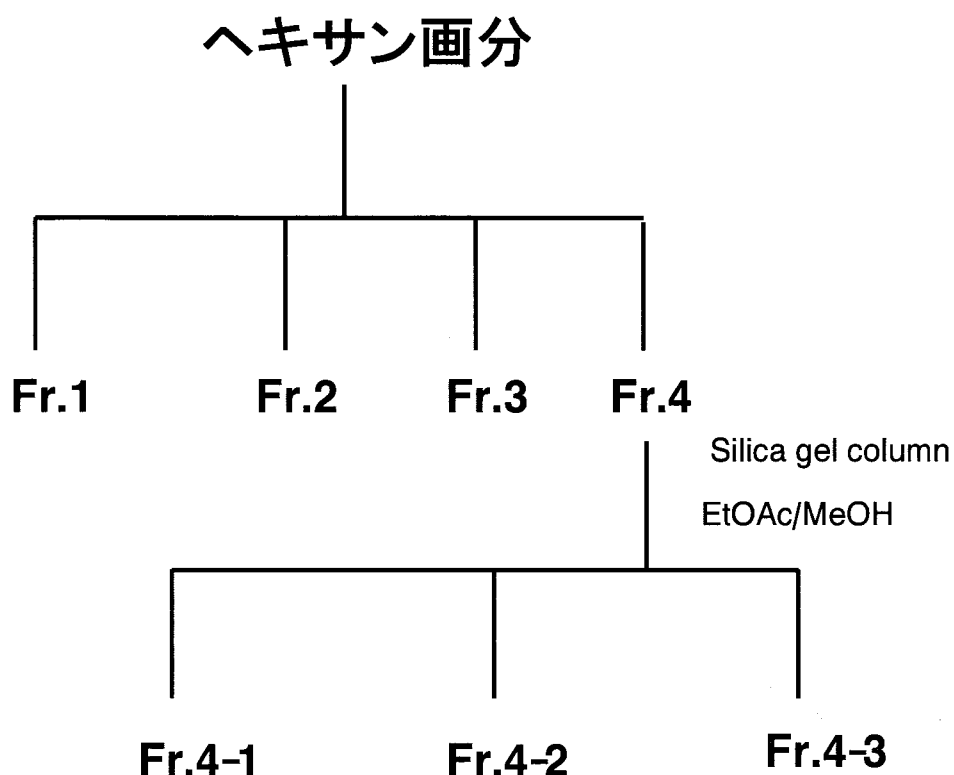


図 2 2 ドクダミ抽出物 Hexane 画分の分画方法

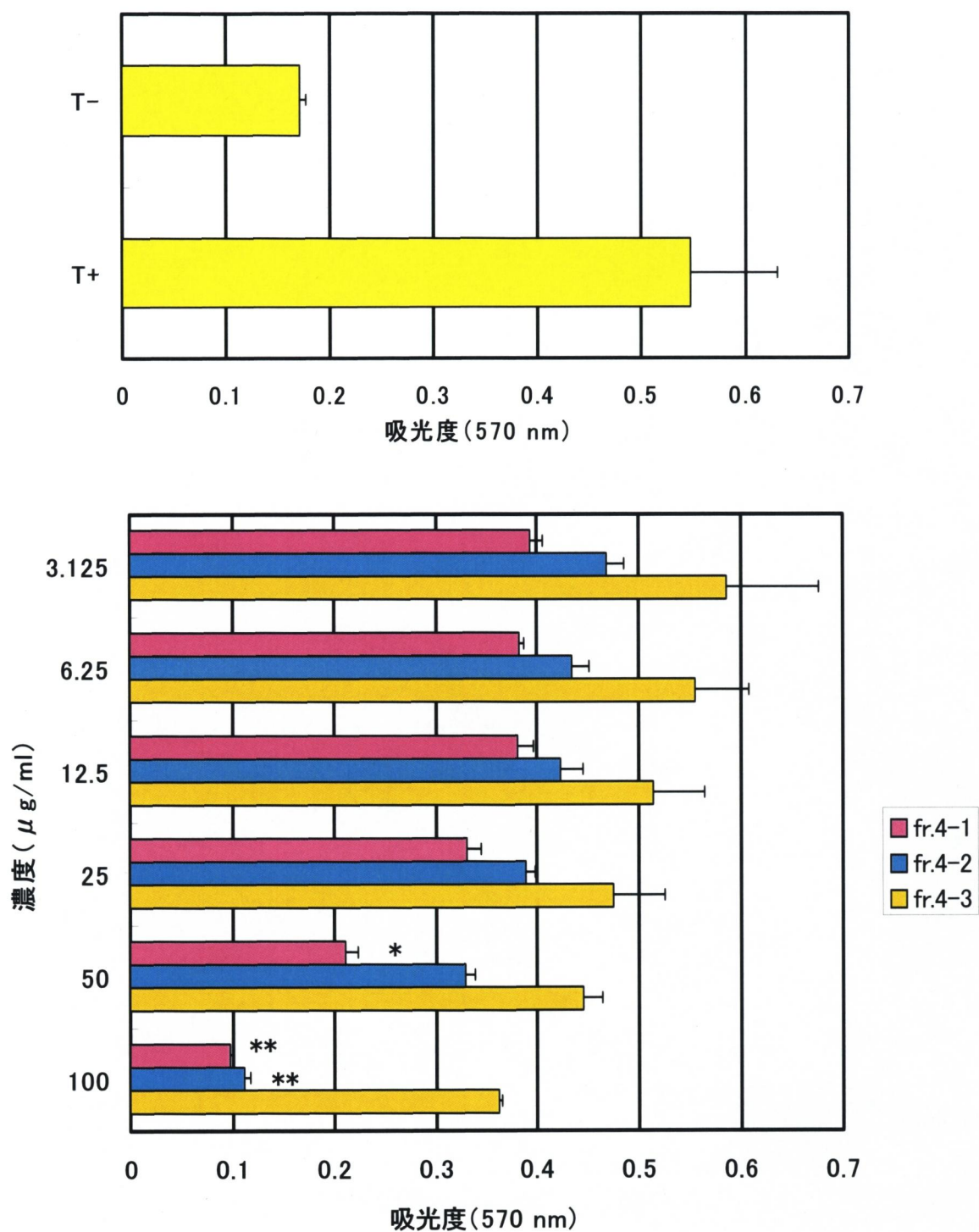


図 2 3 ドクダミ分画物添加による LNCaP 細胞に及ぼす影響

Each value represents mean \pm S.E. ** : P < 0.01 vs T+.

5-5 ドクダミ分画物 (fr.4-1-1、fr.4-1-2) 添加の LNCaP 細胞に及ぼす影響

LNCaP 細胞を用いてドクダミヘキサン画分の fr.4-1 に活性があったことからさらに分画を行った。そこで fr.4-1-1 と fr.4-1-2 活性評価を行った。ドクダミ抽出物を添加しない (T+) を control 群とし、ドクダミヘキサン分画物 (fr.4-1-1 と fr.4-1-2) を添加し濃度が 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$ になるようにした。その結果ドクダミ抽出物を添加しない (T+) に比べて fr.4-1-1 において有意に Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加を抑えた。一方、fr.4-1-2 添加群では Testosterone を添加したのみの Control 群と比較してとくに LNCaP 細胞数に差はみられなかった (図 2 5)。

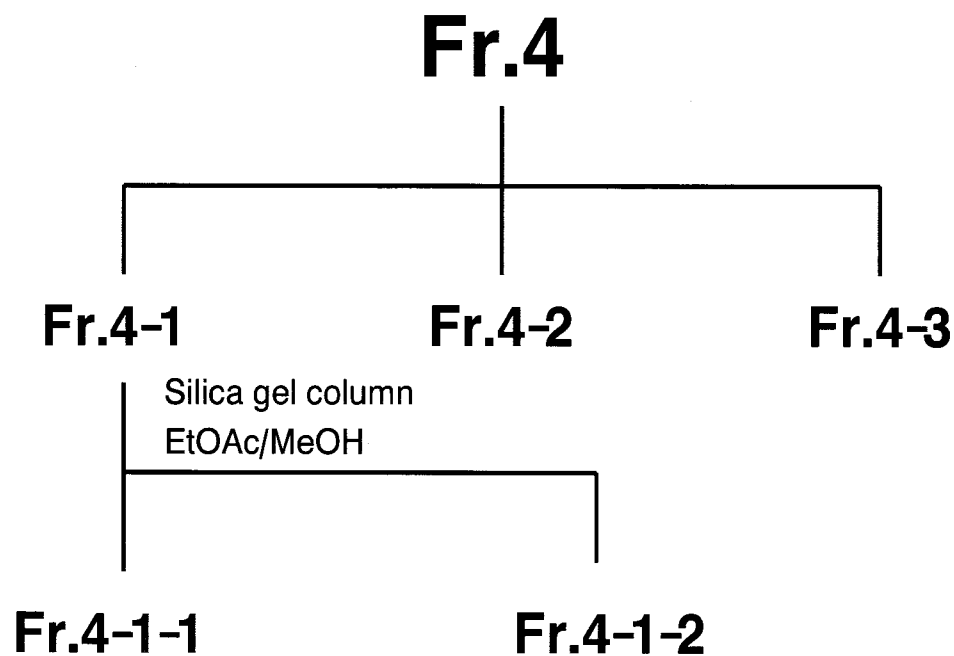


図 2 4 ドクダミ抽出物 Hexane 画分の分画方法

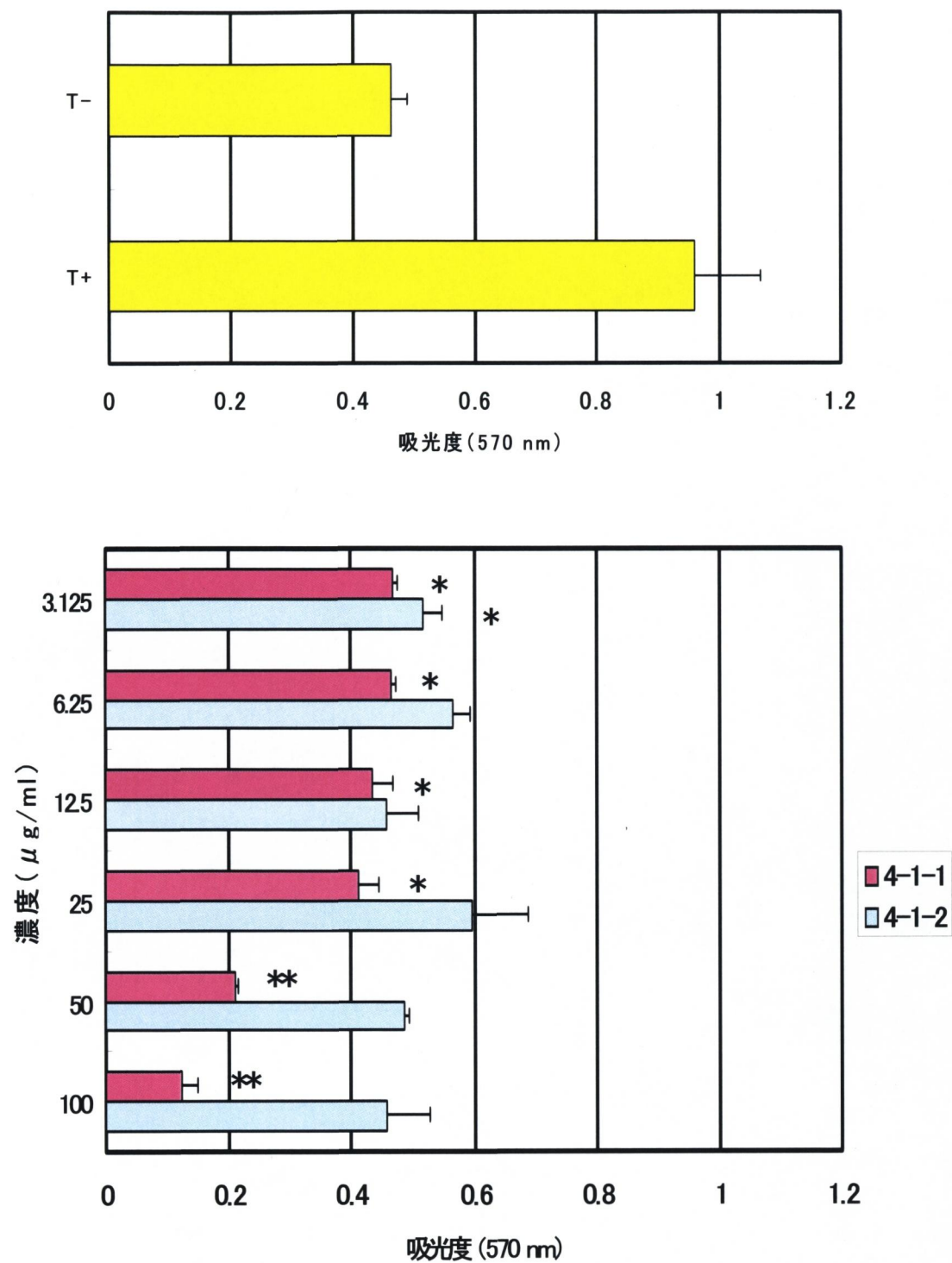


図 2 5 ドクダミ分画物添加による LNCaP 細胞に及ぼす影響

Each value represents mean \pm S.E. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs T+.

5-6 ドクダミ分画物投与のマウス前立腺に及ぼす影響

前立腺肥大モデルを用いてドクダミ水分画物(水画分、30%メタノール画分、100%メタノール画分)の活性評価を行った。マウスは1群5匹で以下のように4群に選別した。投与量は分画し得られた分画物 1/10 を投与した。

control : 去勢+Testosterone 50 mg/Kg

wfr.1 : 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ 水画分 50 mg/Kg

wfr.2 : 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ 30%メタノール画分 10 mg/Kg

wfr.3 : 去勢+Testosterone 50 mg/kg+ドクダミ 100%メタノール画分 10 mg/Kg

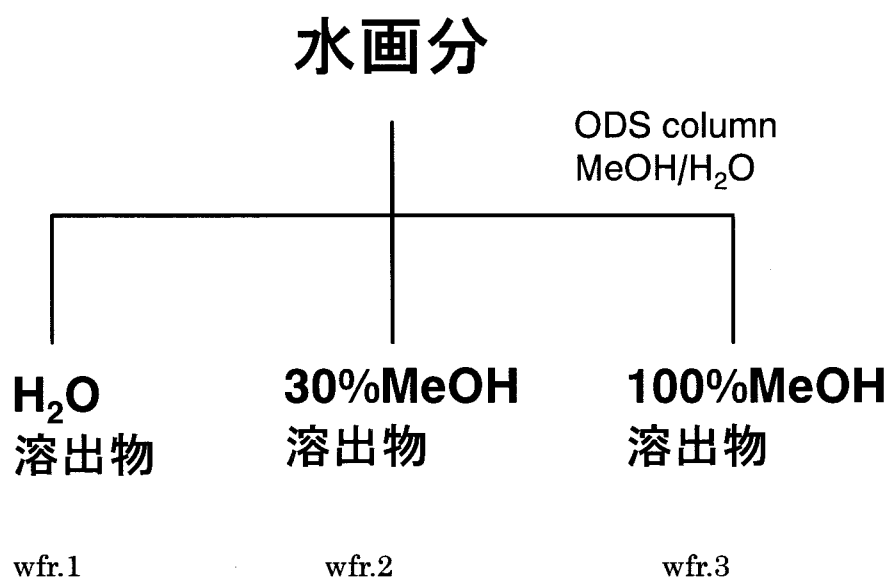


図26 ドクダミ抽出物水分画の分画方法

Testosterone に関してはそれぞれエタノール 10 μ l に溶かしたのちに、コーン油 90 μ l を加えて調製したもの 100 μ l を投与した。精巣摘出の翌日より control、ドクダミ、SP、QC の各群には Testosterone を、去勢群に対してはコーン油 100 μ L を腹腔内注射した。また同時に wfr.1 群に対してはドクダミメタノール抽出物の水画分をさらに分画(図 2 6) した水溶出物を経口投与した。wfr.2 群に対しては 30%メタノール溶出物、wfr.3 群に対しては 100%メタノール溶出物を 2 週間経口投与した。

マウスを解剖後速やかに前立腺を暴露し、その長径と短径の長さをノギスで測定した。その結果、去勢したマウスに Testosterone 50 mg/Kg を腹腔内投与した control 群と比較して、精囊腺重量において wfr.2 投与群において有意な抑制作用が見られた。よってドクダミ抽出物には前立腺肥大抑制作用の有効成分がヘキサン画分と水画分の両方に別々に存在しており、そのうち 1 つは水画分の wfr.2 に活性成分があることがわかった。

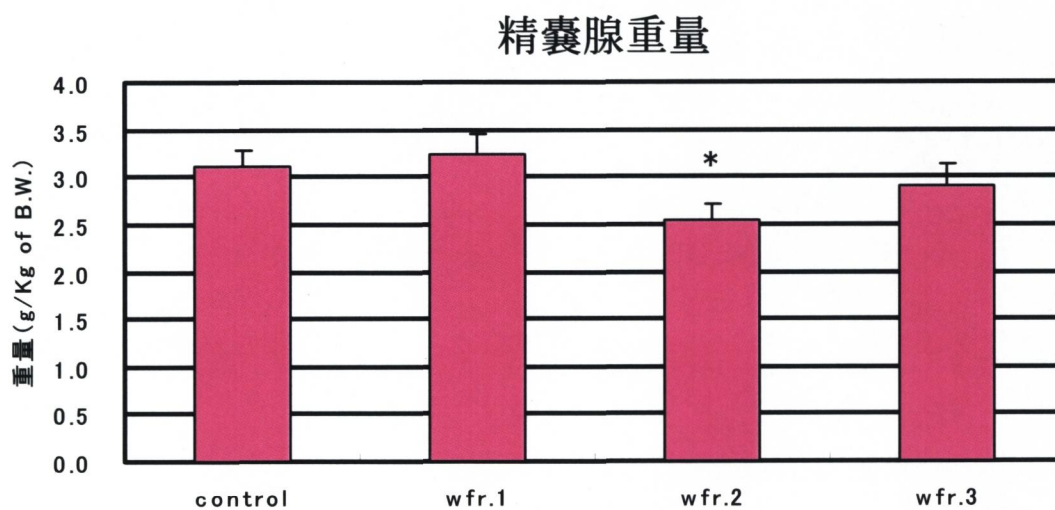
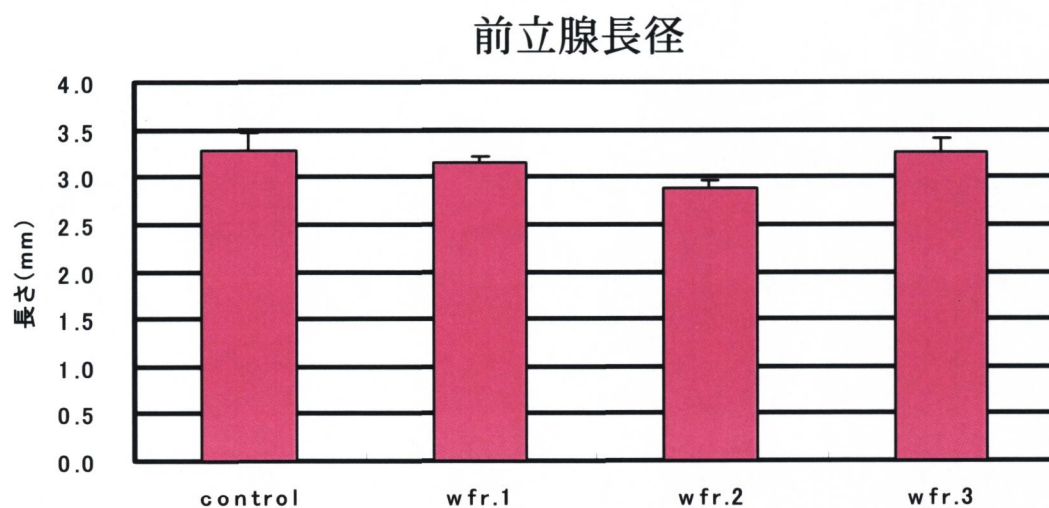
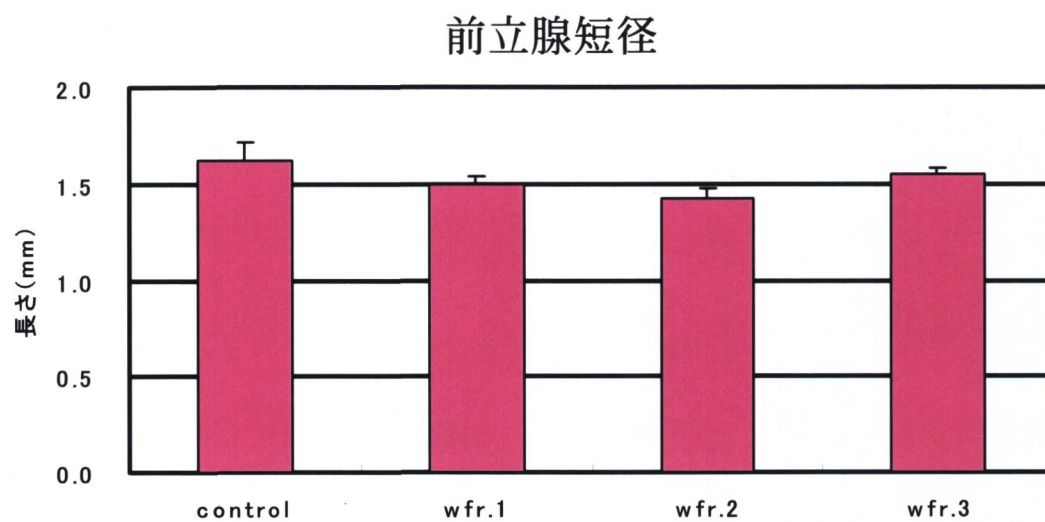


図 2 7 ドクダミ分画物投与による副生殖器への影響

Each value represents mean \pm S.E. * : $P < 0.05$ vs Control

5-7 考察

前立腺、精嚢腺、精巣上体や皮膚のようなアンドロゲン感受性の組織では、Testosterone をより強力な男性ホルモンである Dihydrotestosterone (DHT) に変換することが広く知られている[38]。この変換は、 5α リダクターゼ と補酵素 NADPH により行われる[39]。この Testosterone と DHT の 2 つのアンドロゲンは、同じアンドロゲン受容体に結合するが、Testosterone と DHT は異なる生理機能を有する。胎児発生段階において、Testosterone と DHT は、それぞれ男性の内部および外部生殖器の分化に必須である。男性の思春期後は、Testosterone は筋肉量、精子形成、声帯肥大、リビドーに関する重要なホルモンであるが、DHT は毛髪や前立腺の成長を制御すると報告されている[40]。 5α リダクターゼには、2 つの異なった遺伝子によりコードされたアイソザイムの I 型 (5α -R1) および II 型 (5α -R2) が存在することがラット、マウス、サルおよびヒトにおいて報告されている[41]。 5α -R1 は、多くの部位の皮膚の脂腺に多く発現しており、 5α -R2 は、毛包、前立腺、精嚢腺および精巣上体に発現している。現在までに、ヒトでの 5α リダクターゼの遺伝的な欠損は、 5α -R2 をコードする遺伝子欠損についてのみ報告されている。ヒトにおける発現については、酵素活性や免疫染色等により検討されている。これまでの研究では前立腺の治療および予防においては、この 5α リダクターゼ を阻害する方法とともにアンドロゲンとそのレセプターの結合を阻害する方法が有効とされてきた。前者の場合には 5α リダクターゼ、医薬品としての Finasteride が知られており[42]、食品としてはノコギリヤシおよびペポカボチャなどが広く知られている[43]。また後者の場合では医薬品としての Flutamide が有名である[44]。ノコギリヤシ果実エキスの組成は約 90% ($\pm 5\%$) が脂肪酸であり、内 80% を遊離脂肪酸が占めている。またノコギリヤシ果実エキスの薬理作用としては (1) 抗アンドロゲン作用、すなわち I 型および II 型の 5α リダクターゼ非競合的阻害作用、(2) 抗炎症作用、(3) 細胞増殖抑制作用がある。

今回の研究では、ドクダミ抽出物の前立腺肥大抑制作用の評価を目的として一連の実験を行った。まず LNCaP 細胞にドクダミ抽出物を添加したときの影響をみる実験ととも

にマウスにドクダミ抽出物を投与した際の生殖器への影響をみる実験をおこなった。LNCaP 細胞はアンドロゲンに強く依存して増殖することから考えても、ドクダミメタノール抽出物になんらかの LNCaP 細胞のアンドロゲンの取り込みを抑えるような物質が含まれると推測された。さらにマウスへの投与量検定試験では、精囊腺重量において用量依存的に抑えていたことから、その推測を支持するような結果が得られた。次に、マウスにドクダミメタノール抽出物およびドクダミエタノール抽出物を投与した際の生殖器への影響をみる試験を行った。その結果、Control 群と比較して、ドクダミメタノール抽出物投与群においては前立腺長径で有意に前立腺の肥大が抑制されており、有意差は無いものの前立腺短径においても前立腺の肥大の抑制傾向が観察された。また北海道産のドクダミメタノール抽出物投与群においては、前立腺短径と長径ともに Control 群と比較して前立腺肥大抑制傾向がみられた。精囊腺重量に関しても、Control 群と比較してドクダミメタノール抽出物、ドクダミエタノール抽出物、北海道産ドクダミメタノール抽出物投与群すべてで有意差がみられた。また今回の実験では本大学構内のドクダミ抽出物と北海道産のドクダミ抽出物しか実験に用いていないが、前立腺肥大抑制作用にほとんど差はなかったが、他の地域のドクダミとも比較する必要がある。さらにドクダミを採取する時期の検討も行う必要があったと考えられる。ドクダミの開花時期である 5 月下旬から 6 月頃で、この時期のドクダミはクエルシトリンという成分が最も多く含まれるため薬効が強いとされているからである[41]。

一般に前立腺肥大抑制に効果があるとされ、 5α リダクターゼ阻害作用のノコギリヤシ、ペポカボチャ、また医薬品のアンドロゲンレセプターと DHT の結合阻害する Flutamide、 5α リダクターゼ阻害剤の Finasteride とドクダミを比較するためにマウスに投与した際の影響を調べた試験では、すべての投与群において前立腺長径で有意に肥大抑制がみられた。有意差は無いものの前立腺短径に肥大の抑制傾向が観察された。しかし、精囊腺重量に関してはドクダミ投与群、Flutamide 投与群、Finasteride 投与群のすべての群において、コントロール群と比べて有意な抑制作用が認められるという結果であった。ノコギリ

ヤシ投与群は精囊腺重量に抑制傾向はみられたものの有意な抑制作用はみられなかった。またペポカボチャに関しては Control 群に比べて精囊腺重量が増加している結果となった。ペポカボチャは前立腺肥大抑制に関して実際に科学的証明はされていない。また今回行ったハーシュバーガーアッセイには適していないとも考えられる。この実験結果からドクダミはポジティブコントロールと比較しても医薬品までの効果は高くはないものの前立腺肥大抑制作用が確認された。

ドクダミ成分の中でも利尿作用や血圧調節などの成分であるクエルシトリンは 5α リダクターゼ阻害作用が報告されている[27]。この実験でドクダミに前立腺肥大抑制作用がみられるのはこのクエルシトリンの効果であるとも考えられるので、クエルシトリンをマウスに投与する実験を行った。この実験系においては、マウス前立腺の大きさが小さくて正確に摘出して重量を測定するのが難しいためにノギスでその短径と長径を測定するという方法をとっているが、前立腺を周りの組織から露出させる際に余計な力が加わって短径と長径に誤差が生じることは否めない。一方、マウス精囊腺は比較的大きな組織であり、その組織はアンドロゲンが引き起こす挙動においては前立腺と同じような挙動を示す[28]。そのためこの実験系では精囊腺重量結果の方が信頼度が高いと考え、ドクダミメタノール抽出物に活性成分が存在すると考えてメカニズムの解明と分画を進めていくことにした。

このドクダミ中の物質がどのようなメカニズムでアンドロゲン（ここでは Testosterone）の作用を抑える働きをしているかを解明する実験としてヒト前立腺ガン細胞である LNCaP 細胞を用いた。この細胞はアンドロゲン依存性であり、Testosterone から DHT に変換する酵素である 5α -リダクターゼを細胞自身が持っており取り込んだ Testosterone を DHT に変換することができる。その後 DHT は核内のアンドロゲンレセプター（AR）に結合しタンパク合成を刺激することで細胞中で増殖する [29]。前立腺の治療および予防においては、この 5α リダクターゼ を阻害する方法とともに DHT とアンドロゲンレセプターの結合を阻害する方法があり、ドクダミがどちらの作用により前立腺肥大を抑制しているかを検討した。*In vivo* の実験ではマウスを去勢手術を行わずに正常

なマウスを使用した。去勢手術を行うことにより Testosterone の生産量が低下し、レセプターの数が正常なマウスよりも増えることで生殖器の Testosterone 感受性が高くなるとされている[28]。よって去勢手術を行ったマウスを用いてドクダミ抽出物を投与すると、前立腺の大きさ・精囊腺の重量で抑制作用は観察された。しかし一方で去勢を行わずにドクダミ抽出物を投与した結果、前立腺短径のみ有意に抑制されていたが前立腺長径と精囊腺重量では抑制傾向は観察されたものの有意な差は見られなかった。また LNCaP 細胞を用いた実験では Testosterone とドクダミを同時に添加した場合、濃度依存的に細胞増殖を抑えた。また Testosterone から細胞の 5α リダクターゼによって変換される DHT とドクダミを同時に添加した場合にも濃度依存的に細胞増殖を抑えていた。よって図 2 8 のようにドクダミ抽出物は 5α リダクターゼの阻害ではなく DHT と AR (アンドロゲンレセプター) との結合を阻害すると考えられる。

ドクダミ抽出物と Testosterone 添加によって濃度依存的に LNCaP 細胞増殖が抑制された場合



ドクダミ抽出物と DHT 添加によって濃度依存的に LNCaP 細胞増殖が抑制された場合



図 2 8 ドクダミの前立腺肥大抑制作用メカニズム

次にドクダミの活性成分を同定・単離するために分画を進めた。マウスにドクダミメタノール抽出物をヘキサン画分、90%メタノール画分、ブタノール画分、水画分に分画したものを投与した際の影響試験では、Control 群と比較してドクダミヘキサン画分と水画分投与群において有意に精嚢腺重量の増加が抑えられたため、ヘキサン画分と水画分に抗アンドロゲン活性成分が含まれると考えた。そこからさらにドクダミヘキサン画分を順相シリカカラムで4つに分取することにし、fr.1 から fr.4 を得た。LNCaP 細胞にドクダミヘキサン画分 (fr.1、fr.2、fr.3、fr.4) を添加したときの影響試験ではドクダミヘキサン画分を添加しない群と比べて、fr.4 添加群で濃度が 100、50、25、12.5、6.25、3.125 $\mu\text{g/mL}$ のときに有意に Testosterone 添加による LNCaP 細胞の細胞数の増加を抑えるような結果となった。その結果 fr.4 に抗アンドロゲン活性があることからさらに fr.4 の分画を行った。一方、fr.1 から fr.3 添加群では Testosterone を添加したのみの Control 群と比較してとくに LNCaP 細胞数に差はみられなかった。ここまではドクダミに含まれると考えられる抗アンドロゲン物質の単離・同定を中心において一連の実験を行ってきた。しかしながら、現在 NMR で構造を解析中である。また水画分の活性成分も 30%メタノール溶出物に活性があったが、現在さらに分画を進めているところである。

アンドロゲンが関連する更年期障害としては、前立腺肥大症の他に男性型脱毛症があげられる。アンドロゲンと男性型脱毛症の関係はかなり以前から注目されており、男性型脱毛症に関する研究も盛んになされている[50]。男性において思春期後から始まる男性型脱毛症は、性腺機能の低下した男性や思春期前に去勢された男性では起こらず、アンドロゲンを処置すると脱毛が始まることから、男性ホルモンに依存的であることが明らかにされている。また、 $5\alpha\text{-R2}$ の遺伝的な欠損症により、DHT 量が減少した男性患者は、男性偽半陰陽であり、性別不明瞭な外性器を持って生まれ、小児期には一般的には女性として成長する。思春期になると男性化するが、その後も前立腺は非常に小さい状態であり、顔面部や身体の毛は少なく、男性型脱毛症も起きない。したがって、 $5\alpha\text{-R2}$ による Testosterone から DHT への変換が、男性型脱毛症の発症に深く関与していることがわかっている[52]。

先に序論で述べたように、前立腺肥大症は今や高齢男性の多くが抱えている深刻な問題であり QOL を低下させている一つの大きな要因ともいえる。こういった悩みへの有効な対策の一つに Finasteride があげられ、これは前立腺肥大症に対する薬剤としては Proscar、男性型脱毛症に対する薬剤としては Propecia という医薬品として供されている。

現在、前立腺肥大症や男性型脱毛症を含めたアンドロゲン原因性症状の治療に使用されているのは Flutamide、Finasteride といった医薬品が中心であり、予防を含めた食品として知られているのはノコギリヤシと西洋カボチャなど限られたものしかない。これらの現状からかんがみても、ドクダミに含まれる抗アンドロゲン物質を単離・同定し、その作用メカニズムを解明できれば、多くのアンドロゲンが原因で悩める高齢男性にとっての福音となり、より多くの治療法や予防法の選択の幅を広げる可能性をもっている。こういった観点からも、ドクダミに含まれる抗アンドロゲン物質の構造決定とその作用メカニズムに関しての更なる研究がなされる必要がある。

第6章 総括

現在急速に社会の高齢化が進む日本においては、男性更年期障害が大きな問題となりつつある。男性更年期障害は大きく二つに分けることができる。一つは加齢に伴いアンドロゲン量が低下することによる筋力・骨量の減少および性機能全般の低下であり、その対策としてはホルモン補充療法が有効である。もう一つは前立腺肥大症による排尿障害であり、多くの高齢男性に見られる症状である。こちらは過剰なアンドロゲン作用に起因するものなので抗アンドロゲン療法が有効である。療法としては相対するものになるが、いずれの症状も高齢男性の QOL (Quality Of Life、生活の質) を低下させる大きな問題となっている。そこで本研究では食品による予防医学という観点から、特に天然物由来の抽出物を用いてスクリーニングを行い、ホルモン作動性を有する新規食品素材の探索を目的として行うこととした。

またドクダミ抽出物を用いて試験を行ったところ、*in vitro* 試験において、ドクダミ抽出物存在下では非存在下と比べて LNCaP 細胞数が減少することが確認された。また *in vivo* 試験において、ドクダミ抽出物とともに Testosterone を投与した際にドクダミ抽出物投与群では非投与群と比べて前立腺の大きさ、精囊腺の大きさともに有意に抑制することが確認された。これらの結果から、ドクダミに含まれる成分が抗アンドロゲン様作用を有することが確認された。ドクダミは繁殖力が強く、日本だけでなくアジアでも食用として用いられている植物である。その活用方法を見出すような様々な研究が行われており、ドクダミ抽出物に利尿作用、殺菌作用はすでに知られており、血糖値上昇を抑制する作用があることを見出したという報告もなされている。

現在、前立腺肥大症や男性型脱毛症対策として使用されているのは Flutamide、Finasteride といった医薬品が中心であり、食品として用いられるのはノコギリヤシと西洋カボチャなど限られたものしかない。そのことからドクダミに含まれる抗アンドロゲ

ン物質の単離・同定および作用メカニズムの解明は、多くの悩める高齢男性にとっての福音となり、より多くの治療や予防の選択の幅を広げる可能性をもっている。そういった可能性をより広げるような研究・発表・啓発活動を行い、社会にむけての積極的な情報発信を行うことこそが社会貢献であると考えている。

参考文献

- [1] 藤野知美, 鈴木真由美, 山田静雄, ノコギリヤシ果实抽出液の排尿機能及び下部尿路受容体に対する作用. 日本補完代替医療学会誌 4, 41-50(2007).
- [2] 山田静雄. 高齢者の排尿障害とサプリメントの効果的な利用法. アンチ・エイジング医学 - 日本抗加齢医学会雑誌 Vol.3 No.4 1-7(2007).
- [3] 伊藤直樹, 塚本泰司, 男性更年期の概念. 医学のあゆみ. 205, 380-384 (2003).
- [4] 辻村晃, 松宮清美, 奥山明彦, 古賀実, Bioavailable Testosterone と加齢・性機能. 日本生殖内分泌学会雑誌 9, 19-23 (2004).
- [5] John Morley, H.M. Perry III, R.T. Kevorkian, P. Patrick, Comparison of screening questionnaires for the diagnosis of hypogonadism. *Maturitas*. 53, 424-429 (2006).
- [6] Hargreave, E.J.H. Meuleman, W. Weidner, Hormonal Replacement Therapy for Aging Men The Debate Goes On. *European Urology*. 46, 155-161 (2004).
- [7] Carlo Bettocchi, Late-Onset Hypogonadism (LOH) Incidence, Diagnosis, and Short-Term Effects. *European Urology Supplements*. 4, 4-9 (2005).
- [8] Berry, S.J., Coffey D.S., Walsh P.C., The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J.Urol*. 132, 474-479 (1984).
- [9] Hald Urodynamics in benign prostatic hypreplasia; a survey. *Prostate*. 2, 69-77 (1989).
- [10] 仲野隆久.前立腺肥大症の症状改善効果を示す植物ステロール.Food style21 Vol.11 No.4 53-55(2007)
- [11] 厚生労働省発表. 平成 17 年国民生活基礎調査
- [12] 日本 Endourology・ESWL 学会作成. BPH(前立腺肥大症)診療ガイドライン. (2001).
- [13] Buzelin J.M., Roth S., Geffriaud-Ricouard C., Delauche-Cavallier M.C. Efficacy and safety of sustained-release alfuzosin 5mg in patients with benign prostatic

- hyperplasia. *Urol.* 47, 335-342 (1996).
- [14] Roehrborn Siegel R.L. Saegel and efficacy of doxazosin in benign prostatic hyperplasia; a pooled analysis of three double-blind, placebo-controlled studies. *Urology.* 48, 406-415 (1996).
- [15] Chapple Wyndaele, Nordling J, Boeminghaus F., Tamsulosin, the first prostate-selective α 1A-adrenoceptor antagonist; a meta-analysis of two randomized, placebo-controlled, multicentre studies in patients with benign prostatic obstruction(symptomatic BPH). *Eur. Urol.* 29, 155-167 (1996).
- [16] En L.M., Tveter K.J., A prospective, placebo-controlled study of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist Leuprolide as treatment for patients with benign prostatic hyperplasia. *J. Urol.* 150, 359-364 (1993).
- [17] Shida K., Clinical effects of allylestrenol on benign prostatic hypertrophy by double-blind method. *Acta. Urol. Jpn.* 32, 625-648 (1986).
- [18] Stoner E. Three year safety and efficacy data on the use of finasteride in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urology* 43, 284-294 (1994).
- [19] Hershberger, L.G., Shipley, E.G., Meyer, R.K., Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *P.S.E.B.M.* 83, 175-180 (1953)
- [20] 矢澤一良. ヘルスフード科学講座. 食品化学新聞社 (2007).
- [21] Takashi Nishino, Thilo Wedel, Oliver Schmitt, Katja Bühlmeier, Androgen-dependent morphology of prostates and seminal vesicles in the Hershberger Assay:Evaluation of immunohistochemical and morphometric parameters. *Ann Anat.* 186, 247-253 (2004).
- [22] 菅野純,子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験, (2000).
- [23] 但木桂一、ハルンデール・ネオ（ノコギリヤシ）の前立腺肥大症改善効果, Food Style

21 4,41-43(2007)

- [24] 日本比較内分泌学会編. ホルモン実験ハンドブック 2. 各種溶液と顕微標本. 学会出版センター (1991).
- [25] 日本比較内分泌学会編. ホルモン実験ハンドブック 3 実験のモデル. 学会出版センター (1991).
- [26] J. Ashby, P.A. Lefevre, H. Tinwell, J. Odum, W. Owens, Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgen assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* . 39, 229-238 (2004).
- [27] オリザ油化株式会社 キウイ種子エキスカタログ ver.2.0 JT 4-5(2006)
- [28] Kanji Yamasaki, Masakuni Sawaki, Mineo Takatsuki, Strain sensitivity differences in the Hershberger assay. *Reproductive Toxicology*. 15, 437-440 (2001).
- [29] Lazier Thomas, Douglas, Vessey, Rittmaster, Dutasteride, the Dual 5 α -Reductase Inhibitor, Inhibits Androgen Action and Promotes Cell Death in the LNCaP Prostate Cancer Cell Line. *The Prostate* . 58, 130 -144 (2004).
- [30] Jan Bouchal, Zdenek Kolar, Jana Madarova, Alice Hlobilkova, Erwin von Angerer, The effects of natural ligands of hormone receptors and their antagonists on telomerase activity in the androgen sensitive prostatic cancer Cell line LNCaP. *Biochemical Pharmacology*. 63, 1177-1171 (2002).
- [31] Kanji Yamasaki, Masakuni Sawaki, Shoji Noda, Takako Muroi, Saori Takakura, Hideo Mitoma, Satoko Sakamoto, Makoto Nakai, Yoshikuni Yakabe, Comparison of the Hershberger assay and androgen receptor binding assay of twelve chemicals. *Toxicology* . 195, 177-186 (2004).
- [32] Takashi Nishino, Thilo Wedel, Oliver Schmitt, Katja Bühlmeier, Martin Schönfelder, Christian Hirtreiter, Thorsten Schulz, Wolfgang Kühnel and Horst

- Michna, Androgen-dependent morphology of prostates and seminal vesicles in the Hershberger Assay: Evaluation of immunohistochemical and morphometric parameters. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 186, 247-253(2004)
- [33] R. Hamid, Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh and P. Bullock, Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening, *Toxicology in vitro*. 18(5), 703-710 (2004).
- [34] 赤嶺基一郎. ホルモン作動性を有する新規食品素材の探索. 東京海洋大学修士学位論文 (2007).
- [35] Julianne Imperato-McGinley, Ramon S. Sanchez, Julia R. Spenser, Comparison of the Effects of the 5 α -Reductase Inhibitor Finasteride and the Antiandrogen Flutamide on Prostate and Genital Differentiation: Dose-Response Studies. *Endocrinology*. 131(3), 1149-1156 (1992).
- [36] 日本化薬株式会社. オダイン錠添付文書.
- [37] 東京都食品環境指導センター. 「くらしの衛生」平成 13 年度検査結果
- [38] Hiroyuki Kojima, Eiji Katsura, Shinji Takeuchi, Kazuhito Niiyama, Kunihiro Kobayashi, Screening for Estrogen and Androgen Receptor Activities in 200 Pesticides by In Vitro Reporter Gene Assays Using Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ Health Perspect*. 112, 524-531(2004).
- [39] 麻生芳郎、一目でわかる内分泌学 ホルモンと受容体の基礎知識 54-59 (2003).
- [40] Adriane Fugh-Berman, "Bust enhancing" herbal products. *Obstetrics & Gynecology* 101, 1345-1349(2003)
- [41] 伊澤一男. 薬草カラー図鑑 3. 主婦の友社. (1996).
- [42] Kyriakos Pratis, Liza O'Donnell, Guck T. Ooi, Robert I. McLachlan, David M. Robertson, Enzyme assay for 5 α -reductase Type 2 activity in the presence of 5 α -reductase Type 1 activity in rat testis. *Journal of Steroid Biochemistry &*

- Molecular Biology*. 75, 75–82 (2000).
- [43] Kristina M. Wasson, Stephen A. Watts, Proscar® (Finasteride) inhibits 5 α -reductase activity in the ovaries and testes of *Lytechinus variegatus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 120, 425-431 (1998).
- [44] Elliot Fagelman, Franklin C. Lowe, Saw Palmetto Berry as a Treatment for BPH. *Rev Urol*. 3(3), 134–138 (2001).
- [45] Luis A. Justulin Jr., Rodrigo P. Ureshino, Michelle Zanoni, Sergio L. Felisbino, Differential proliferative response of the ventral prostate and seminal vesicle to testosterone replacement. *Cell Biology International* 30, 354-364 (2006).
- [46] 福住仁, 池田孝則, 成田裕久, 男性における男性型脱毛症用薬 5 α -還元酵素II 型阻害薬 Finasteride (プロペシア®錠 0.2 mg・1 mg) の薬理学的特性と臨床効果. *Folia Pharmacol. Jpn*. 127, 495-502 (2006).
- [47] Hamilton J.B., Male hormone stimulation is a prerequisite and an incitant in common baldness. *Am.J.Anat.* 71, 451-480 (1942).
- [48] Keith D. Kaufman, Androgens and alopecia. *Molecular and Cellular Endocrinology* 198, 89-95 (2002).
- [49] E. David Crawford, Testosterone Substitution and the Prostate. *European Urology Supplements* 4, 16-23(2005)
- [50] Leonard S. Marks, David L. Hess, Frederick J. Dorey, Maria Luz Macairan, Paul Bryan Cruz Santos and Varro E. Tyler, Tissue effects of saw palmetto and finasteride: use of biopsy cores for in situ quantification of prostatic androgens. *Urology* 57, 999-1005(2001)
- [51] Imtiaz Siddiqui, S. Raisuddin and Yogeshwer Shukla, Protective effects of black tea extract on testosterone induced oxidative damage in prostate. *Cancer*

- [52] Vincenzo Mirone, Ferdinando Fusco, Paolo Verze, Claude Schulman, Frans Debruyne and Ciro Imbimbo, Androgens and Benign Prostatic Hyperplasia. *European Urology Supplements* 5, 410-417 (2006).
- [53] Keith Kaufman, Androgens and alopecia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 198, 89-95 (2002).
- [54] Vera H. Price, Emory Menefee, Matilde Sanchez, Patrick Ruane and Keith D. Kaufman, Changes in hair weight and hair count in men with androgenetic alopecia after treatment with finasteride, 1 mg, daily. *Journal of the American Academy of Dermatology* 46, 517-523 (2002).
- [55] Hossein Amini and Abolhassan Ahmadiani, In vivo evidence for an increase in 5 α -reductase activity in the rat central nervous system following morphine exposure. *International Journal of Developmental*, 621-626 (2005).

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導を頂きましたヘルスフード科学（中島董一郎記念）寄附講座の矢澤一良客員教授、ならびに小山智之客員准教授に深く感謝の意を表します。

本論文を作成するに当たり、多大なるご指導を頂きました本学保健管理センター木谷誠一教授に深く感謝の意を表します。

ヘルスフード科学講座運営に当たり多大なるご支援とご協力を頂きました株式会社中島董商店、及びキューピー株式会社に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに当たり、多大なるご配慮を頂きました湘南予防医科学研究所の大塚伊津子主任研究員、興石君子氏、三瓶英子氏に厚く御礼を申し上げます。

最後に、有益な助言また激励を下さいましたグループリーダーである博士後期課程1年、赤嶺基一郎さん、諸先輩方、同期の皆様、そしてヘルスフード科学講座で3年間一緒に切磋琢磨してきた練尾有香さん、研究室の皆様に感謝致します。